UNIVERSITE DE PARIS V - R. DESCARTES

Faculté de Médecine COCHIN PORT-ROYAL

ANNEE 1973

13

T H E S E

pour le

D O C T O R A T EN M E D E C I N E

(Diplôme d'Etat)

par

DREYFUSS Antoine
né le 6 Février 1943 à Saint Affrique (Aveyron)

Présentée et soutenue publiquement le : 1973

TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE des LYMPHOCYTES EN CULTURE AU CONTACT de la TUBERCULINE

(Travail de la Fondation ROTHSCHILD)

Paris 12ème.

PRESIDENT :

UNIVERSITE DE PARIS V - R. DESCARTES

Faculté de Médecine COCHIN PORT-ROYAL

ANNEE 1973

T H E S E

pour le

D O C T O R A T EN M E D E C I N E

(Diplôme d'Etat)

par

DREYFUSS Antoine
né le 6 Février 1943 à Saint Affrique (Aveyron)

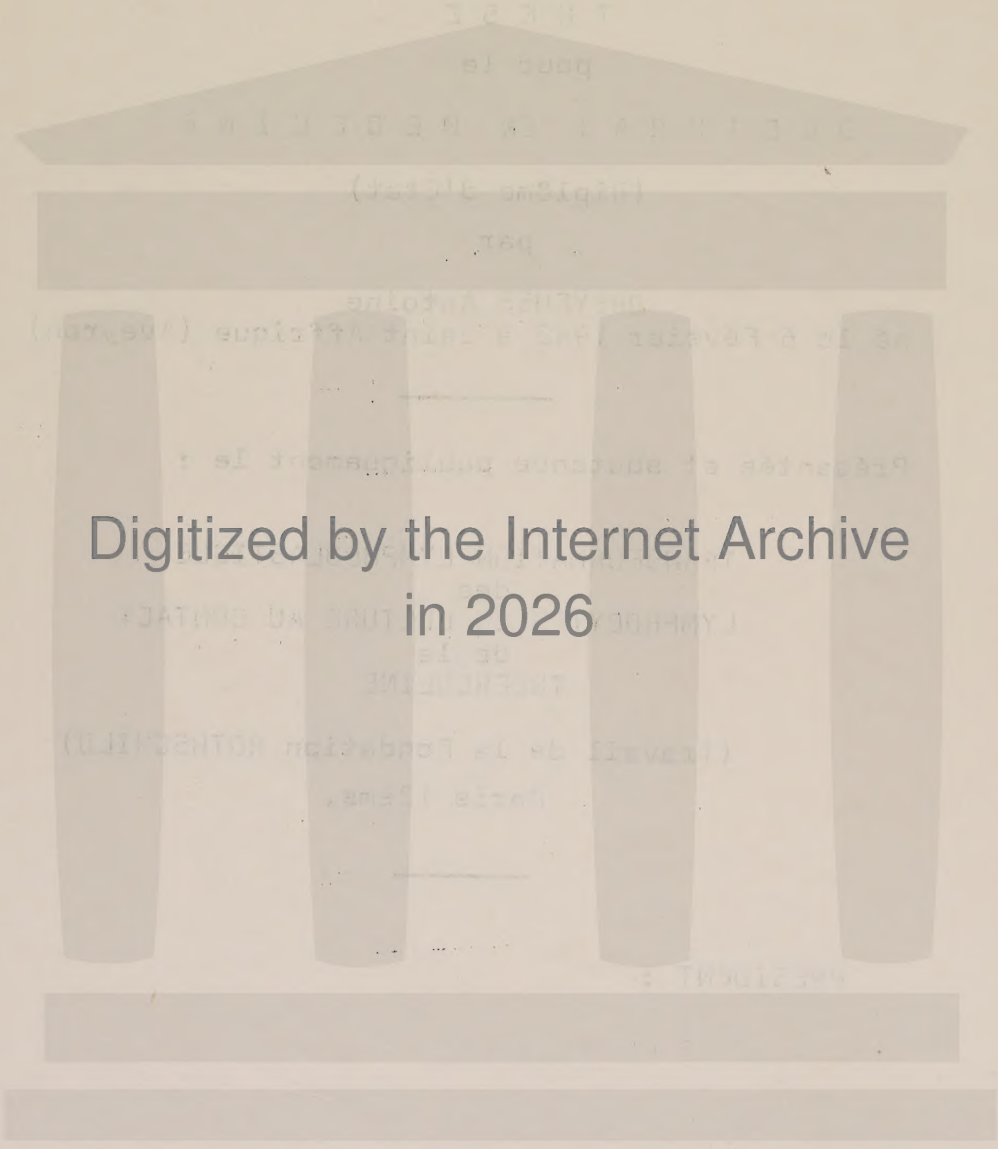
Présentée et soutenue publiquement le :

TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE des LYMPHOCYTES EN CULTURE AU CONTACT de la TUBERCULINE

(Travail de la Fondation ROTHSCHILD)

Paris 12ème.

PRESIDENT :



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544710_0037

A mes Parents

A ma femme et à Stéphanie

A mes frères

A toute ma famille

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A MES MAITRES DANS LES HOPITAUX

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

- Comme Stagiaire

  - M. Le Doyen CORDIER
  - M. Le Professeur SICARD
  - M. Le Doyen BROUET
  - M. Le Professeur Jean MATHEY

- Comme Externe

  - M. Le Professeur LOEPER
  - M. Le Docteur GOSLAN
  - M. Le Doyen LOYGUE
  - M. Le Professeur KOURILSKY
  - M. Le Professeur CONTE
  - M. Le Docteur Guy ALBOT
  - M. Le Docteur Sam LEWI

A Monsieur le Docteur Sam LEWI

Médecin de l'Hôpital Rothschild .

En remerciement de l'aide précieuse

qui m'a permis de réaliser ce travail.

Aux Docteurs :

. Lucien LEVY

. GLAZMANN

Assistants de l'hôpital Rothschild.

En souvenir de notre ancienne collaboration.

INTRODUCTION

La distinction entre l'immunité cellulaire et humorale a été entrevue depuis longtemps. Dès la fin du siècle dernier, il a été démontré que certains phénomènes immunitaires peuvent être transmis par des humeurs dépourvues de cellules, (anticorps contre les agents infectieux, bactériens ou viraux, anticorps supports de la sensibilité anaphylactique) ; ces anticorps sont sécrétés par des cellules qui prennent l'aspect morphologique du plasmocyte, considéré pendant longtemps comme seule cellule sécrétrice d'anticorps.

D'autres phénomènes immunitaires ne peuvent pas être transmis par le sérum, telle la sensibilité tuberculinique. Landsteinner et Chase ont montré que cette sensibilité peut être transmise par des éléments cellulaires mononucléés.

La même distinction peut être faite dans les tests qui éprouvent "in vivo" la sensibilité aux antigènes spécifiques : en cas de sensibilisation de type humoral, on déclenche des réactions à apparition immédiate ; au contraire, en cas de sensibilité de type cellulaire, c'est la réaction de type retardé qui survient dont l'exemple le plus courant est la réaction tuberculinique.

Les études plus récentes portant notamment sur la structure chimique des anticorps, sur le rôle du thymus dans les phénomènes d'immunité, sur nos possibilités de culture cellulaire "in vitro" et leurs réactions à différents stimulants, ont apporté une contribution importante à nos connaissances, non seulement en confirmant la réalité de cette dualité, mais encore en précisant la détermination cellulaire au cours des phénomènes immunitaires.

Il est désormais admis que l'élément central des réactions immunologiques en ce qui concerne l'une et l'autre de ces formes d'hypersensibilité, est le lymphocyte du sang circulant et des organes lymphoïdes, que ces éléments sont en état de recirculation permanente, mais que la fonction de ces lymphocytes diffère selon leur origine.

C'est ainsi que les lymphocytes d'origine thymique sont plus particulièrement responsables des phénomènes d'hypersensibilité retardés et qu'au contraire, les lymphocytes dits "burso dépendants" (c'est-à-dire provenant d'organes comparables à celui individualisé chez les oiseaux : la bourse de Fabricius), sont plus particulièrement impliqués dans les réactions qui comportent la sécrétion d'anticorps circulants. Ce classement quelque peu schématique (car il est prouvé qu'une interaction des deux types de lymphocytes est souvent nécessaire dans les réactions immunitaires) a projeté une très grande clarté sur les mécanismes fondamentaux de l'immunité et a fourni une méthode d'étude supplémentaire par l'examen direct "in vitro" des éléments cellulaires au contact des antigènes spécifiques.

Parmi ces méthodes, l'étude des lymphocytes en culture est actuellement le moyen le plus précis pour la mise en évidence de leur sensibilité.

Le point de départ de cette méthode est l'observation de NOWELL (40) en 1960 qui a montré les potentialités évolutives exceptionnelles du lymphocyte sous l'influence d'un extrait de haricot - (Phaseolus vulgaris) : la phytohémagglutinine (PHA). Cette substance antérieurement connue pour ses propriétés d'agglutination vis-à-vis des hématies et des leucocytes provoque en quelques jours lorsqu'elle est mise en culture avec des leucocytes, une transformation des petits lymphocytes en lymphoblastes, dont un certain nombre est en état de mitose.

Les propriétés de la PHA, analogues à celles d'autres substances (extrait de Phytolacta americana, streptolysine S, filtrat staphylococcique...) aboutissent donc dans les cultures de courte durée à l'apparition de lymphoblastes et de mitose aux dépens de la majorité des lymphocytes du sang périphérique humain normal ; c'est une action non spécifique de certains mitogènes.

Très tôt en 1963, on s'est aperçu que de telles substances mitogènes ne sont pas les seules capables de provoquer la transformation blastique et qu'un phénomène analogue survient lorsque les lymphocytes sont cultivés en présence d'antigènes spécifiques auxquels l'organisme est sensibilisé.

Ainsi, sous l'influence de la tuberculine mise en culture avec les lymphocytes, on observe, comme avec la PHA, une augmentation du nombre des mitoses, une transformation blastique des lymphocytes et une augmentation de la synthèse des acides nucléiques, comme le montrent des études avec des précurseurs isotopiques. Mais cette transformation n'affecte qu'un nombre restreint de lymphocytes et dépend de l'état de sensibilisation antérieure du sujet vis-à-vis de la tuberculine, témoignant d'une réaction immunologique spécifique. Les lymphocytes des sujets vierges de toute infection tuberculeuse et non vaccinés par le BCG ne subissent aucune transformation au contact de la tuberculine.

Il y a donc ici la possibilité d'étudier le phénomène dans ses diverses formes : transformation morphologique, synthèse des acides nucléiques et libération spécifique de toute une série de substances solubles, douées de propriétés diverses telles que la formation d'une réaction inflammatoire sur la peau, cytotoxité (le surnagement de cellules tue les fibroblastes en culture), chimiotactisme vis-à-vis des polynucléaires, inhibition de la migration des macrophages, pouvoir mitogène sur les lymphocytes.

La génèse de tous ces facteurs se produit à la faveur d'une réaction étroitement spécifique, mais une fois libérés ces substances agissent de façon non spécifique.

Dans le présent travail nous n'envisagerons que les réactions qui se produisent dans une culture lymphocytaire et qui ont trait à la transformation des lymphocytes in vitro sous l'influence de la tuberculine.

CHAPITRE PREMIER

DESCRIPTION ET HISTORIQUE DU PHENOMENE

I - Description du phénomène

Les lymphocytes provenant du sang périphérique ou des organes hémopoiétiques de sujets préalablement sensibilisés vis-à-vis d'un antigène spécifique, cultivés en présence de cet antigène, subissent une transformation analogue à celle que détermine la phytohémagglutinine.

Ce phénomène comporte la différenciation du petit lymphocyte en une cellule plus jeune ; tous les stades intermédiaires peuvent être observés entre le petit lymphocyte arrivant au lymphoblaste typique, à la mitose.

Cette action de la tuberculine sur les lymphocytes en culture provenant de sujets allergiques est l'exemple le plus connu de la transformation au contact d'antigènes spécifiques. C'est celui qui a été décrit en premier et qui continue à être largement utilisé dans les travaux expérimentaux en raison de sa netteté.

Photo 1 :
Test de transformation lymphoblastique
en présence de P.H.A. (5e jour de culture).

La transformation du petit lymphocyte en cellule d'allure blastique se caractérise par des modifications morphologiques autant que biochimiques.

Au microscope optique :

Après coloration au May Grunwald Giemsa, le blaste se présente comme une grande cellule de 20 à 30 μ de diamètre, au cytoplasme fortement basophile, habituellement séparé du noyau par une bande claire et parsemé de nombreuses vacuoles claires.

Le noyau apparait gros, arrondi ; il possède une chromatine homogène et des nucléoles.

Ces cellules souvent agglomérées, en amas, sont plus nombreuses à la périphérie du frottis ; quelques unes d'entre elles sont en mitose, plus fréquemment en prophase ou en télophase.

Le nombre de lymphoblastes en mitose ne dépasse pas habituellement 3 %, sauf si on bloque les mitoses pendant quelques heures par de la colchicine.

Des formations en rosette sont parfois observées, formations dont le centre est occupé par une cellule phagocytaire entourée de petits lymphocytes en voie de transformation.

Au microscope électronique :

Le microscope électronique assure une analyse plus fine de la structure du lymphoblaste. C'est une grande cellule dont le cytoplasme et le noyau ont subi une augmentation proportionnelle.

Le noyau a un aspect variable ; parfois, la chromatine apparait fine, ailleurs elle est condensée en mottes à la périphérie. Il contient une ou plusieurs nucléoles.

Le cytoplasme se caractérise par la richesse en particules ribosomiques, apparaissant sous forme de petites vésicules ou de sacs lamellaires aplatis. Il renferme également des mitochondries en nombre variable.

L'appareil de GOLGI est bien développé ; un caractère particulier est l'existence de corps électroniquement opaques, présents en grand nombre et correspondant aux vacuoles claires visibles au microscope optique.

Au point de vue cytochimique :

Les méthodes cytochimiques ont permis une distinction plus précise entre les trois types cellulaires :

lymphocyte,
macrophage,
lymphoblaste,

La richesse en protéines :

est appréciée par l'intensité de la coloration au mercure de bromophénol bleu.

La teneur en acide nucléique :

est appréciée par la coloration de la méthylgreen pyroxine..

La synthèse protéique semble en rapport avec la richesse en ribosomes et l'augmentation de la déshydrogénase glutamique transformation du lymphocyte.

Le cytoplasme du lymphocyte et du granulocyte :
apparait faiblement teinté.

Les vacuoles du macrophage ne sont pas colorées ; et apparaissent dans un cytoplasme faiblement coloré.

A l'inverse, le noyau et le cytoplasme du lymphoblaste sont intensément colorés, le noyau plus fortement que le cytoplasme.

La teneur en glycogène est appréciée grâce à la coloration par l'acide périodique de SCHIFF (PAS) ; on constate la disparition progressive du glycogène pendant la transformation que subit le petit lymphocyte. Les cellules blastiques sont alors PAS négatives.

II - Historique

Dès 1926, TIMOFEJEWSKY et BENEWOLENSKAJA (52) rapportent que les lymphocytes humains pouvaient se transformer en blastes et en cellules épithéloïdes en présence de bacilles tuberculeux ; cette description est tombée dans l'oubli.

En 1960, MOORHEAD et NOWELL (40) décrivent une méthode de culture de leucocytes du sang humain.

La même année, NOWELL découvre qu'un extrait de haricot (Phaseolus vulgaris), la Phytohémmagglutinine connue pour ses propriétés d'agglutiner les hématies et les leucocytes du sang humain, augmente dans une culture de leucocytes le nombre des mitoses et provoque la transformation blastique d'un grand nombre de lymphocytes.

De 1960 à 1964, de nombreux auteurs ont essayé de montrer que l'action "stimulante" de la PHA vis-à-vis des lymphocytes était un phénomène immunologique. Pour cela, ils ont comparé l'action, en culture de lymphocytes, de la phytohemmagglutinine et de divers antigènes vis-à-vis desquels les sujets avaient été ou non préalablement sensibilisés.

En 1963, ELVES & ROATH (18) étudiant sur des cultures de lymphocytes l'action de différentes toxines de vaccins (TAB, toxine tétanique) montrent que les sujets antérieurement sensibilisés ont une transformation blastique voisine de celle obtenue avec la PHA.

Ils montrent pour la première fois que la tuberculine chez les sujets ayant des réactions cutanées positives à celle-ci, provoquait in vitro la transformation blastique des lymphocytes.

Le rôle de la tuberculine en tant qu'antigène spécifique étant démontré, la plupart des auteurs ont alors essayé d'établir des relations précises entre la transformation lymphoblastique in vitro en présence de tuberculine et l'état des réactions cutanées à cette même tuberculine, c'est-à-dire entre la réaction d'hypersensibilité retardée cutanée et la réponse blastique (COWLING, SCHRECK, PEARMAN & LYCETTE en 1963). (13 - 14 - 15 - 43 - 48)

En 1964, ASPEGREN (2) pense que l'élévation du nombre de mitoses sous l'influence de la tuberculine n'est pas assez régulière pour être prise comme méthode d'appréciation de l'allergie tuberculinique.

Il reconnait cependant que la stimulation in vitro serait supérieure aux réactions cutanées à la tuberculine, comme indication de la résistance acquise et comme témoin de l'état d'immunité.

En 1965, MAC FARLAND et ses collaborateurs (36) tentent la première étude comparative quantitative entre les réactions cutanées et la transformation blastique en utilisant diverses fractions protéiniques de mycobactéries.

Les autres tentatives pour établir un rapport précis entre les réactions cutanées et la transformation blastique ont donné depuis cette époque des résultats divers et parfois controversés.

En 1967, GUMP et ses collaborateurs (21) ne retrouvent aucune relation quantitative.

A l'inverse, ZWEIMAN en 1966 (50-51) travaillant sur le cobaye
KRAVIS et KERBY, en 1968 (29-30), travaillant chez l'homme, trouvent une excellente corrélation quantitative entre les réactions cutanées et les réactions in vitro.

Nous ne terminerons pas cette brève revue historique sans faire mention des travaux étudiant ces phénomènes dans divers états :

physiologiques chez l'enfant en 1968 : MATSANIOTIS (38)
ou
pathologiques
- au cours de la tuberculose active en 1967 THOMAS et RAUCH (46-49)
- au cours de syndromes myeloprolifératifs et de la Sarcoïdoseen 1964 : HIRSCHORN et COWLING (14-28)
- au cours d'avitaminose C expérimentales chez le cobaye en 1965 : ZWEIMAN (51).

Dès cette simple chronologie des découvertes, il apparaît que si le pouvoir mitogène, de transformation blastique, de la tuberculine est généralement admis, l'aspect quantitatif entre les réactions cutanées et la transformation in vitro reste encore discuté.

Nous allons dans un premier temps nous efforcer de décrire et d'analyser les différentes méthodes de préparation et de culture des lymphocytes en présence de tuberculine, les méthodes de lecture et les résultats.

Nous envisagerons ensuite les rapports entre les réactions intradermiques et la transformation des lymphocytes, puis les aspects particuliers de la transformation lymphoblastique en fonction des divers états physiologiques et pathologiques, notamment à la lumière de nos propres travaux portant sur deux cent huit (208) sujets agés.

CHAPITRE II

-:-:-:-:-:-:-:-:-

TECHNIQUES DE CULTURES

Elles ont toutes pour base la méthode mise au point par MOORHEAD et NOWELL, utilisée initialement pour l'étude des chromosomes des leucocytes.(40)

Nous allons la décrire, puis nous reprendrons chaque point en précisant les modifications et améliorations apportées à la technique par les différents auteurs.

I - Méthode de MOORHEAD et NOWELL :

- Le sang est prélevé par ponction veineuse dans une seringue héparinée (10ml)

- On y ajoute de la phytchémagglutinine à la concentration de 0,2ml/10ml; on mélange puis on laisse reposer 30 minutes à 1 heure dans un bain de glace. La PHA est utilisée ici pour ses propriétés d'agglutination des globules rouges, donc pour permettre une meilleure séparation du plasma et des hématies. (C'est d'ailleurs lors de cette expérience qu'on remarqua l'effet mitogène de la PHA)

- On centrifuge alors le tube (25% x 5 à 10mn) puis on compte le nombre de leucocytes dans le plasma surnageant au microscope.

- Les leucocytes sont alors mis en culture dans des tubes contenant
  30 à 40 % de plasma frais autologue ou homologue
  60 à 70 % d'un milieu de culture dit TC 199
  de la pénicilline et de la streptomycine

- Les cultures de 8 à 10ml contiennent chacune :
1 à 1,2 x 10^6 leucocytes/ml

- Le PH est maintenu constant et les cultures sont mises à l'étuve à 37 ° pendant environ 76 heures.

70 heures après le début de la culture, on ajoute de la colchicine pour bloquer d'éventuelles mitoses en métaphase.

- Enfin, avant la lecture au microscope, les cultures subissent deux centrifugations.

Cette méthode de NOWELL cultive donc tous les leucocytes et non pas exclusivement des lymphocytes, et ne comporte en culture, aucun élément de stimulation.

II - Préparation des lymphocytes

Toutes les méthodes dérivent, nous l'avons dit, de celle décrite précédemment (Nowell 1960) (40) modifiée notamment en 1962 par Quaglino, Hayhoe et Flemans.

La majorité des auteurs estime qu'il est préférable de procéder à la stimulation des lymphocytes avant d'avoir testé les sujets aux différents antigènes, de manière à ne pas modifier les résultats in vitro, que pourrait entrainer l'introduction récente d'un antigène dans l'organisme.

Seul ZWEIMAN (50) comparant les réponses cutanées et lymphocytaires chez le cobaye à la tuberculine, prélève le sang 48 heures après avoir pratiqué les tests tuberculiniques cutanés.

a) - Le prélèvement sanguin, comme dans la méthode initiale, se fait stérilement dans une seringue héparinée (doses variant entre 100, 300, et 1000 unités (Zweiman), qui ne modifient en rien les résultats).

b) - La séparation plasma-masse érythocytaire est faite de façon variable suivant les auteurs :

- Certains sont partisans d'une sédimentation simple sans aucun artifice (Schreck, Caron) (7-3-48).

Le sang prélevé sur héparine, est agité avec celle-ci, puis laissé à sédimenter dans des tubes inclinés à 45°, jusqu'à l'apparition d'une ligne de démarcation nette entre hématies et plasma généralement encore riche en globules rouges et polynucléaires, ce qui amène à pratiquer une seconde sédimentation simple, jusqu'à ce que les globules rouges forment, au fond du tube, un dépôt à contour net. La culture est alors faite avec le plasma surnageant, riche en lymphocytes.

Caron fait la deuxième sédimentation après avoir mêlé plasma et milieu de culture, ce qui entrainerait une sédimentation partielle des polynucléaires.

La première sédimentation est faite à une température de 4° et dure environ deux heures.

D'autres auteurs tentent d'améliorer et d'accélérer cette sédimentation par diverses méthodes :

a) physiques : - en complétant la première sédimentation par une centrifugation de quelques minutes (5 à 30 ') à des accélérations de 1 à 25 g).

- SCHRECK (48) filtre la suspension à travers de la laine de verre siliconée qui retient granulocytes et monocytes. (cf. résultats p. 26).

- GUMP (21) filtre également le plasma à travers des filtres de nylon.

b) chimiques : des substances macromoléculaires comme le dextran ou la gélatine modifiée accélèrent la séparation plasma-globules rouges.

- ASPEGREN (2) ajoute 2,5ml de Dextran à 6 % aux 10ml de sang hépariné.

- ZWEIMAN (50-51) ajoute un égal volume de Dextran à 3 %

- COULSON et CHALMERS (11 - 12) travaillant sur du sang défibriné, ajoutent au sang du carbonate de fer et de la cellulose méthylée, mélange qui provoque la sédimentation après centrifugation sur aimant des érytrocytes, granulocytes et monocytes, et laisse donc les lymphocytes en suspension presque pure.

c) - Concentration des leucocytes dans le plasma et la culture :

Le tableau suivant montre les concentrations en leucocytes optimales, suivant les divers auteurs :

TABLEAU N° I

Nombre de Leucocytes optimal en culture :

	Plasma	culture
Nowell	1,7 x 10^6/ml	1 x 10^6/ml
Aspegren	1 à 2 x 10^6/ml	
Caron	2,5 x 10^6/ml	5 x 10^6/ml
Coulson et Chalmers		2 x 10^6/ml
Notre expér.	4 x 10^6/ml	1 x 10^6/ml

On voit donc que la concentration optimale de leucocytes varie entre 1,7 et 4 x 10^6 leucocyte/ml de plasma, et 1 et 5 x 10^6 par ml de culture.

Le pourcentage optimum de lymphocytes dans le plasma ou la culture, est bien entendu également important à déterminer.

Ce pourcentage, varie légèrement suivant les méthodes de séparation.

- Après sédimentation simple,

Caron (7-8) obtient avec 2,5 x 10^6 leucocytes/ml de plasma : 29 % de polynucléaires, et 71 % de lymphocytes.

Notre expérience : avec une méthode similaire, il est courant d'obtenir d'emblée, plus de 80 % de lymphocytes dans le plasma surnageant.

- Après centrifugation mécanique, le pourcentage de lymphocytes obtenu est voisin

- Après adjonction de substances accélératrices :

Zweiman (50-51) avec le dextran trouve 80 à 90 % de lymphocytes dans le plasma.

Coulson et Charmers (11-12) 2 x 10^6 petits lymphocytes/ml de culture dont 90 à 99 % de lymphocytes.

Schreck (48) après filtration à travers de la laine de verre, 90 à 97 % de lymphocytes.

On voit donc que si avec les "méthodes accélératrices", on obtient un plus fort pourcentage de lymphocytes en suspension, les méthodes de sédimentation simple donnent également de bons résultats.

La plupart des auteurs sont maintenant d'accord pour exiger une concentration minimale en lymphocytes de 70 % dans le plasma.

La concentration en petits lymphocytes du surnageant peut être ajusté, soit par adjonction de cellules lymphocytaires, soit par dilution avec du plasma acellulaire.

III - Culture des lymphocytes

a) - Milieu de culture

Le milieu nutritif de culture des lymphocytes utilisé est soit le TC 199 (Difco), soit le TC 109 (Difco) ; exceptionnellement du sérum de veau agammaglobulinémique.

Le plasma riche en lymphocytes est réparti dans différents tubes contenant le milieu nutritif. Les proportions milieu culture/plasma sont variables.

MAC FARLAND (36) observe la proportion :
2ml plasma
3ml TC 109

SCHRECK (48)
1/2 plasma
1/2 milieu TC 199

ASPEGREN (2) — 3ml plasma
7ml milieu culture

ZWEIMAN (50-51) — utilise un mélange de 2ml de sérum de veau et 5ml de TC 199

Certains auteurs ajoutent au milieu des antibiotiques ; la pénicilline et la streptomycine sont fréquemment utilisées à des doses variant de 100 à 500 unités de pénicilline et de 100 à 500 de streptomycine.

b) - Adjonction et concentration de l'antigène tuberculinique :

La tuberculine employée comme antigène pour stimuler les lymphocytes est, soit de la vieille tuberculine non purifiée, brute, soit de la tuberculine purifiée PPD (chauffée et précipitée par l'acide trichloracétique).

La meilleure concentration de tuberculine à adjoindre au milieu de culture pour obtenir une transformation des lymphocytes a été bien étudiée.

1 - Vieille tuberculine ou tuberculine brute

COWLING en 1963 (15) : étudiant le pourcentage de cellules blastiques en culture avec différentes dilutions de vieille tuberculine obtient les résultats suivants chez deux sujets ayant des réactions cutanées positives à cette préparation : (tableau n° 2).

TABLEAU II

SUJET	TEMPS	DILUTION DE VIEILLE TUBERCULINE					
		1/25	1/250	1/2500	1/25000	1/250000	1/2500000
DC	3 jours	3	3	4	1	1	0
DC	7 jours	2	12	8	13	2	0
ED	3 jours	2	9,5	9,5	8	5	1,5
ED	7 jours	10	6	14	16	4	1
moyenne des réponses	7 jours	6	9	11	14,5	3	0,5

C'est donc la dilution au 1/25000 de tuberculine brute qui donne la plus forte proportion de cellules blastiques en culture au 7ème jour.

COWLING & QUAGLINO en 1965 (13) trouvent un résultat analogue : (Tableau III) "Transformation blastique à divers antigènes en culture de leucocytes".

TABLEAU III

Cellules du donneur	Antigène	Temps (jours)	Pourcentage de cellules lymphoblastiques en culture incubées avec un antigène pour une dilution finale de 1 ml.					
			25	250	2500	25000	250000	2500000
C	vieille tuberculine	3	3	3	4	1	1	0
		7	2	12	8	13	2	0
D		3	2	9,5	9,5	8	5	1,5
		7	10	6	13	16	4	1

ASPEGREN en 1964 (2) utilise une dose de 55 unités de tuberculine/m de culture soit une dilution de 1/2.000.

- 2 Tuberculine purifiée PPD :

Coulson et Chalmers (11) (fig 1) utilisant pour critère de réponse, l'indice corrigé, ont comparé cet indice à des doses variables de tuberculine PPD (l'indice corrigé se définit comme le rapport suivant :

$$\frac{1000\ (nt-nc)}{(N)}$$

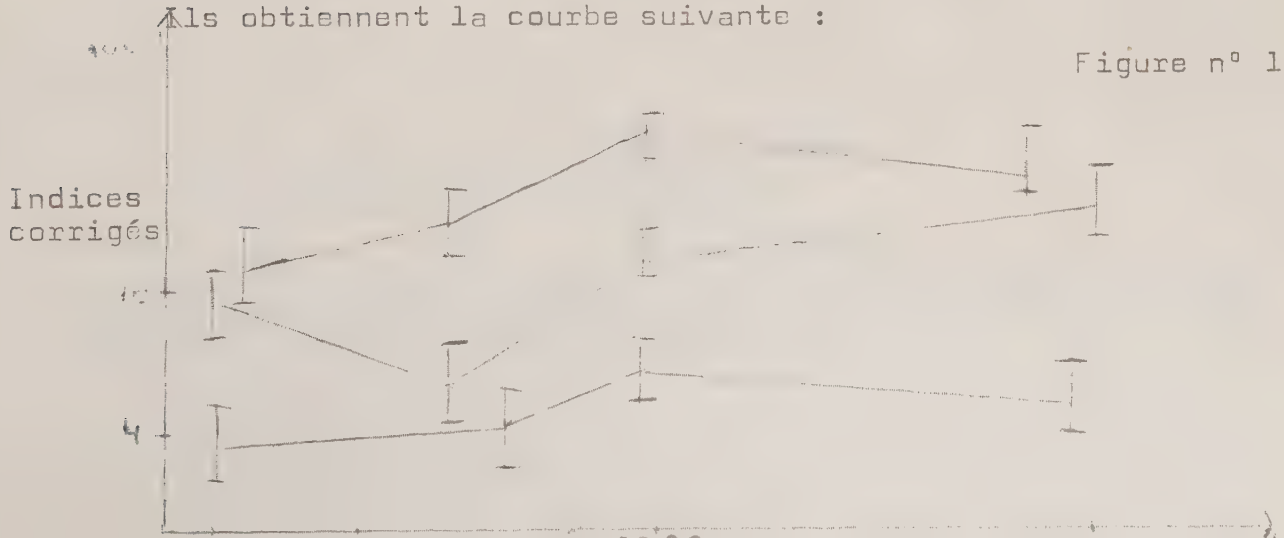
nt : nombre de cellules transformées par m3 dans la culture étudiée au moment de l'expérience.

nc : nombre de cellules transformées par m3 dans la culture de contrôle au même moment.

N : Nombre de petits lymphocytes par m3 au début de la culture.

Ils obtiennent la courbe suivante :

Figure n° 1



La dose de 250 unités (soit 5 γ de tuberculine PPD/mm3, de milieu de culture) stimule le plus grand nombre de lymphocytes et permet ainsi la meilleure distinction entre les lymphocytes de sujets sensibilisés et non sensibilisés.

CARON (7-8) étudiant également la dose optimale de tuberculine PPD, par des procédés de comptage isotopique que nous verrons plus loin, trouve que dans des cultures contenant 3,55 x 10⁶ lymphocytes, au 7ème jour de culture et exposé à de la thymidine tritiée, la concentration optima de PPD/ml est de 1,25mg/ml, soit 62,5U/internationale.

Enfin HARTOG (22) étudie le pourcentage de rétention de thymidine tritiée en fonction des doses de tuberculine PPD chez des sujets Mantoux + et Mantoux nég. et obtient les résultats comme indiqué page 15. fig.2.

GUMP en 1967 (21) étudie encore cet aspect du problème par autoradiographie et trouve les résultats ci-après tableau IV chez 22 sujets sains ayant des réactions cutanées positives à la tuberculine PPD

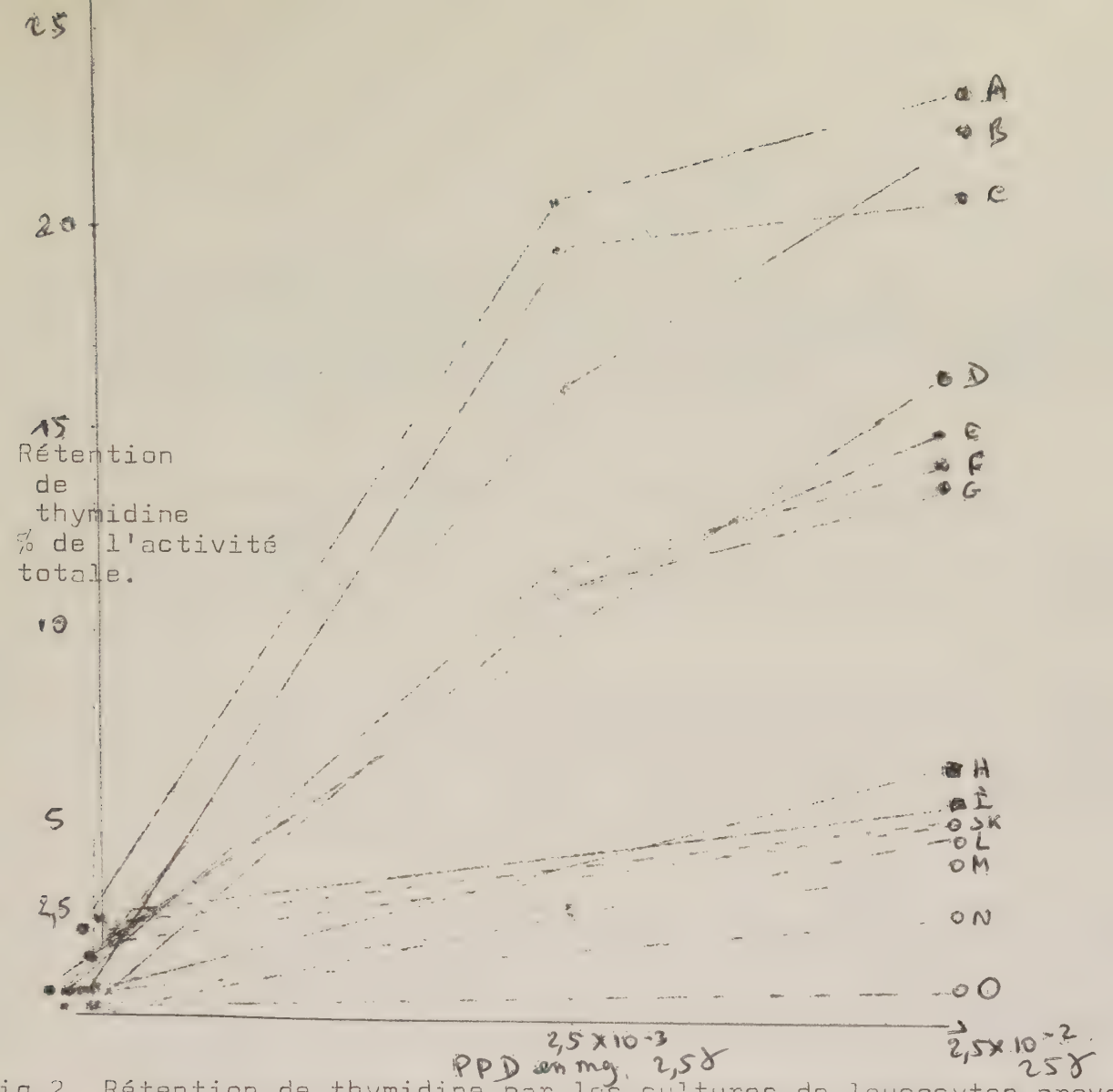
Pourcentage de cellules mononuclées marquées en cultures de leucocytes.

TABLEAU N° IV

Sujets Numéros	N° PPD (contrôle)	γ de PPD/ml dans le milieu de culture				réponses moyennes des sujets	réponses moyennes corrigées
		1γ	5γ	20γ	40γ		
12	0,1	0,8	0,3	0,1	0,3	0,4	0,3
12a +	0,4	-	0,8	-	0,2	0,5	0,1
13 +	0,4	-	0,1	-	0,6	0,4	0,0
13a +	0,3	0,0	0,3	0,1	0,1	0,1	0,0
14 + +	0,0	-	1,1	-	0,4	0,8	0,8
15 + +	1,3	1,7	1,4	2,1	2,5	1,9	0,6
16 +	0,2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3
17	0,0	4,0	-	-	2,2	3,1	3,1
18	0,0	1,2	-	-	0,9	1,1	1,1
19	0,9	1,2	2,2	1,5	2,3	1,8	0,9
20	0,7	2,6	1,7	2,1	2,9	2,3	1,6
21	0,1	1,5	1,5	1,5	1,1	1,4	1,3
22	0,0	-	0,6	0,3	0,2	0,4	0,4

+ (sujet ayant des réactions cutanées
+ (positives avec de la tuberculine
PPD de deuxième force (1004)

On voit donc ici que la réponse lymphocytaire mesurée par autoradiographie avec de la thymidine tritiée est indépendante de la concentration de l'antigène tuberculinique.



ig 2 Rétention de thymidine par les cultures de leucocytes provenant de sujets Mantoux + et Mantoux -, après exposition à diverses doses de tuberculine PPD.

- sujets Mantoux + à la PPD force intermédiaire (=1/2000 OT)
- sujets Mantoux + à la PPD deuxième force (=1/100 OT)
- sujets Mantoux nég. à la PPD deuxième force (=1/100 OT)

d'après HARTOG (22)

La Mesure de la synthèse des acides nucléiques dans les lymphocytes en voie de prolifération.montre une stimulation portant sur un pourcentage généralement élevé de lymphocytes exposés à des doses d'antigènes tuberculiniques très diverses, avec cependant un optimum variable dans chaque cas particulier.

C) Durée de la culture avec l'antigène tuberculinique

Les premières études de transformation lymphoblastique ont été faites par comparaison entre l'action stimulante de la PHA et de la tuberculine brute. COWLING 1963 (15) : voir tableau VII et VIII p. 24-25.

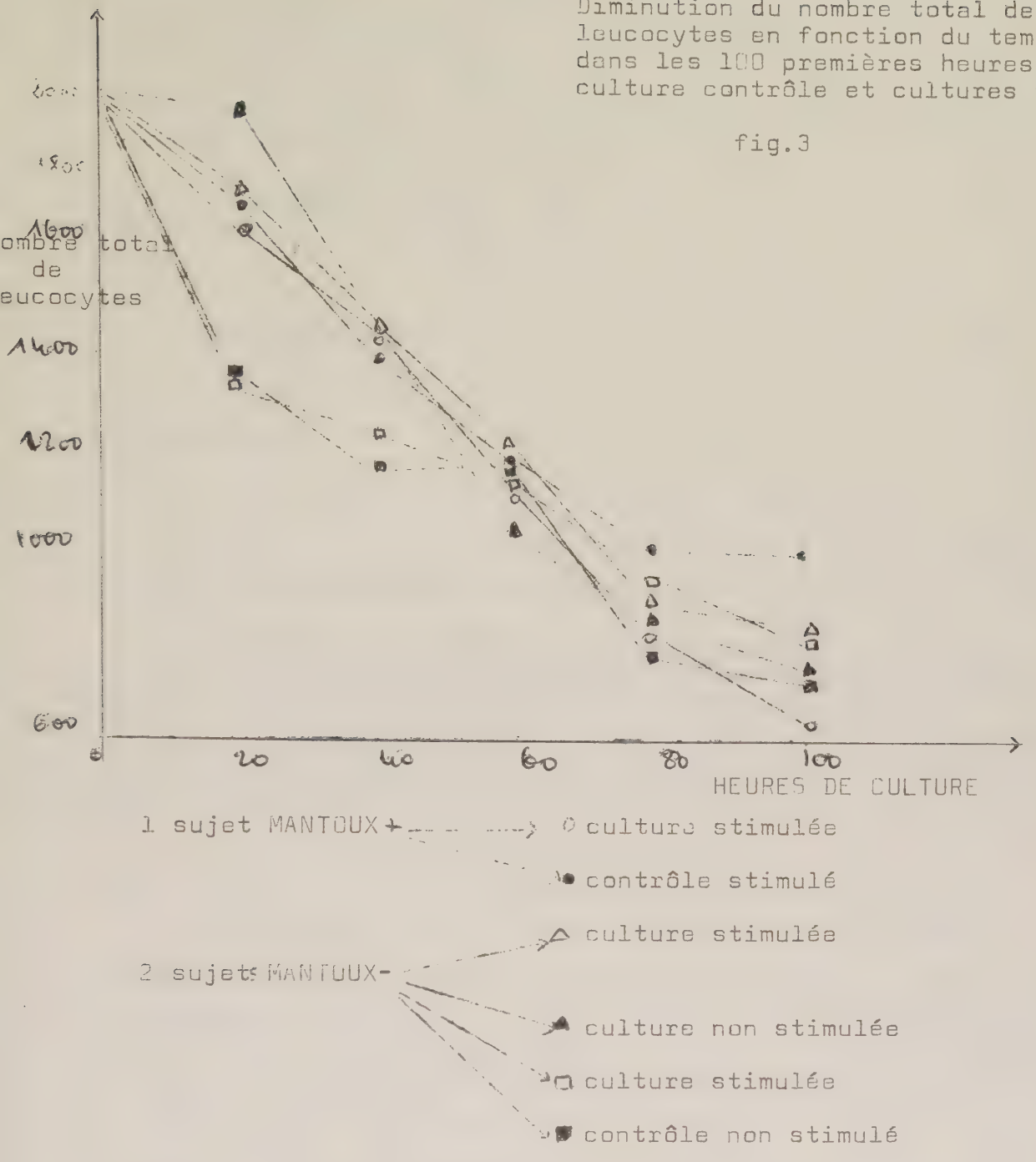
Dans les cultures de sujets Mantoux +, avec de la tuberculine,rien ne se passe dans la culture pendant trois jours, puis la transformation blastique se fait lentement, parallèlement à une augmentation de l'incorporation de thymidine tritiée dans les cellules blastiques jusqu'au 7ème jour, tandis que l'action de la PHA est immédiatement importante.

MARSHALL (37), étudiant la survenue des mitoses dans les cultures stimulées par la PHA et la tuberculine chez des sujets Mantoux +, montre qu'avec la tuberculine, la réponse leucocytaire est plus longue à survenir. Les mitoses n'apparaissent pas avant 120 heures, alors qu'il suffit de 48 heures avec la PHA. Il montre aussi qu'à 120 heures, apparaissent dans la culture de grandes cellules. basophiles.

COULSON et CHALMERS (11) ont d'abord étudié les variations du nombre de cellules avec le temps dans les cultures de donneurs sensibilisés à la tuberculine PPD et non sensibilisés. Les résultats sont les suivants : fig. 3 p. 13 et tableau V page 15.

Diminution du nombre total de leucocytes en fonction du temps dans les 100 premières heures pour culture contrôle et cultures test.

fig.3



Compte fait sur 1000 cellules.

D'après COULSON et CHALMERS (11) ainsi que les tableaux suivants.

TABLEAU N° V

TYPE DE CELLULE	NOMBRE DE CELLULES A UNE HEURE DONNEE Sujets MANTOUX +					
	0	20	40	60	80	100 Heur
- Petits lymphocytes	1996,9	1639,0	1348,9	939,6	691,3	515,1
- Autres cellules lymphoïdes	2,4	1,0	3,0	0,2	11,0	2,3
- Monocytes	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
- Cellules transformées	0,0	0,0	17,8	15,0	45,7	56,0
- Cellules en mitose	0,0	0,0	0,0	0,2	0,5	1,6
- Granulocytes	0,2	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0
- Macrophages	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5	0,0
TOTAL	2000	1640,0	1370,0	955,0	750,0	575,0

Le moment idéal d'observation est donc pour ces auteurs, celui où toutes les cellules capables de se transformer l'ont fait, alors que le nombre total de cellules en culture n'a pas diminué de manière significative ; il est de 90 heures.

Mais en étudiant l'évolution du nombre de lymphocytes après 90 heures, ils trouvent encore un certain pourcentage de cellules transformées comme le montre le tableau suivant : (Tableau n° VI)

TABLEAU N° VI

CULTURE DU RESTE DES LYMPHOCYTES APRES 90 HEURES :

Donneurs	Antigène	Compte final	% cellules transformées
CM	Tuberculine	420	0,3
	Nul	935	0,3
CC	Tuberculine	600	0,6
	Nul	805	0,5
CE	Tuberculine	590	0,02
	Nul	1050	0,06
VE	Tuberculine	1320	3,8
	Nul	885	0,4
AH	Tuberculine	730	1,6
	Nul	1200	0,3
MC	Tuberculine	660	1,1
	Nul	1000	0,3
MH	Tuberculine	860	1,3
	NUl	590	0,2

On voit donc que le temps d'incubation des lymphocytes en culture avec l'antigène tuberculinique n'est pas totalement codifié

Tout le monde est d'accord pour admettre que l'activité mitotique avec la tuberculine commence à 72 heures de culture, mais le moment de lecture varie selon les auteurs entre :

90 heures	-	COULSON et ZWEIMAN (11, 12, 50, 51)
96 -	-	MAC FARLAND - (36)
120 -	-	SCHRECK, CHAPARAS (48,9)
168 -	-	CARON (7,8)

IV - METHODE DE LECTURE ET D'APPRECIATION DES RESULTATS

Elles sont de deux types :

- les méthodes d'appréciation optique
- les méthodes utilisant des substances isotopiques incorporées dans la synthèse des acides nucléiques cellulaires.

a) Les méthodes optiques

Ce furent les premières méthodes employées. Elles le sont toujours ; elles consistent à compter au microscope optique, sur un échantillon de la culture fixée et colorée sur lame :

- soit le pourcentage des mitoses
- soit le pourcentage des lymphoblastes et de cellules intermédiaires ou les deux à la fois.

NOWELL (40) et quelques autres ajoutent aux cellules 4 à 6 heures avant la récolte de la colchicine pour bloquer les mitoses en métaphase. D'autres, tel HIRSCHORN (26,27) utilisent de la vincaleucoblastine.

Des échantillons sont prélevés sur différents flacons (on a réparti les lymphocytes en culture dans 4 à 5 flacons avec une culture témoin sans tuberculine).

Ces échantillons de culture sont fixés sur lame et colorés par le MAY-GRUNWALD GIEMSA,

puis lus au microscope ; afin d'obtenir un pourcentage d'éléments valables statistiquement, un nombre important de cellules doit être compté.

NOWELL (40) et MAC FARLAND (36) comptent 2000 cellules.
ASPEGREN (2) 1600 élémebts en tout,
ZWEIMAN (50,51) va jusqu'à 10 000 éléments (1000 cellules dans 10 cultures).

Nous-mêmes, examinons 4 000 éléments en tout provenant de 4 cultures identiques à chaque expérience de stimulation.

b) Les méthodes utilisant des substances isotopiques :

Le principe consiste à introduire dans le milieu de culture des éléments radioactifs précurseurs des acides nucléiques et à étudier leur incorporation aux lymphocytes qui se transforment.

On utilise soit des acides aminés marqués soit des nucléosides pyrimidiques marqués et on mesure soit le pourcentage de cellules en culture ayant incorporé l'élément par autoradiographie, soit la rétention de l'élément marqué par la culture grâce à des méthodes de comptage utilisant un compteur à scintillations.

On sait que les mitoses sont toujours précédées d'une synthèse de DNA cellulaire.

Dès que l'on a mis en évidence l'action mitogène et lymphostimulante de la PHA, on a pensé qu'il s'agissait d'un phénomène immunologique avec production d'anticorps (ces anticorps ont d'ailleurs été mis en évidence par une méthode utilisant des antiglobulines fluorescentes). Les anticorps sont de nature protéique. C'est alors que l'on a eu l'idée d'étudier cette production de protéines en mesurant l'importance de l'incorporation de précurseurs marqués, adjoints au milieu de culture, et à utiliser cette incorporation comme index des réponses à une stimulation antigénique.

En 1963, HIRSCHORN, (27,28) étudiant la stimulation des lymphocytes par la PHA utilise comme index de réponse l'incorporation de phénylalanine C14 aux protéines des cellules en culture avec la PHA.

En 1963 et 1965, MICHOLOWSKI et AISENBERG (1) ont montré que la rétention de thymidine radioactive par une culture de leucocytes pouvait être utilisée comme index de la synthèse de DNA.

1 - Les premières méthodes isotopiques utilisaient pour moyen de mesure l'autoradiographie.

L'élément radioactif, la thymidine tritiée est introduite dans des cultures de durée donnée (3 ou 7 jours pour COWLING).

Elle est incubée 1 heure avec celles-ci,

puis on met un film photographique en contact avec la culture pendant environ 6 jours.

au 6ème jour, on compte le nombre d'impacts radioactifs ayant impressionné le film photographique, c'est-à-dire, le pourcentage de cellules incorporant la thymidine tritiée dans leur ADN (1000 à 3 000 cellules sont examinées).

COWLING (13-14) a ainsi comparé l'action de la PHA et de la tuberculine chez des sujets sensibilisés ou non à cet antigène par des méthodes visuelles :

- pourcentage de blastes
- pourcentage de cellules prenant la coloration à l'acide périodique de SCHIFF

et par des méthodes d'autoradiographie à la thymidine (voir tableau aux résultats).

Il a ainsi montré qu'il y avait une évolution parallèle des pourcentages de blastes et d'incorporation, donc que les méthodes utilisant un précurseur marqué pouvaient être utilisées pour étudier le phénomène de la transformation blastique.

Cette méthode utilisant la thymidine tritiée et l'autoradiographie a été reprise et utilisée par de nombreux auteurs.

GUMP (21) en 1967, KERDY (29) en 1968 : ce dernier estime cette méthode plus objective que les méthodes visuelles.

2 - Méthodes utilisant un compteur à scintillation :

HARTOG (22) en 1967 décrit une autre méthode d'appréciation des résultats. Il étudie la rétention de la thymidine C14 par un compteur à scintillation pour des cultures de lymphocytes avec PHA et PPD.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité totale apportée.

CARON (7) en 1967 utilise également la rétention de thymidine, mais cette fois tritiée, dans un compteur à scintillation.

Le procédé est le suivant :

- Le dernier jour de la culture, de la thymidine tritiée est ajoutée (2,5 µ Curie/0,1ml à chaque tube).
- Après une heure d'incubation à 37°, la culture de lymphocytes est récoltée par centrifugation.
- Le dépôt cellulaire est lavé trois fois dans 10 volumes de NaCL à 9 %.
- Après une dernière centrifugation, on ajoute une goutte de péroxyde d'hydrogène à 3 % et les cellules sont chauffées 15 mn au bain-marie (pour évacuer le reste de péroxyde).
La décoloration des cultures est immédiate.
- Le dépôt cellulaire est dissout dans 1,5ml de solvant Ncs
- On ajoute 10ml d'une solution phosphorée benzénique et on transfère dans un compteur à scintillation pendant 12 heures à l'obscurité.
- Les résultats sont exprimés en désintégration par minute (voir tableau des résultats).
- Une méthode analogue est utilisée par CHAPARAS (9) en 1970.

V - Notre technique de culture et de stimulation

Toutes les opérations sont conduites stérilement.

Le sang prélevé sur héparine chez des sujets à jeun, subit une première sédimentation spontanée (sans adjonction de substance macromoléculaire accélératrice) et ceci jusqu'à l'apparition d'une ligne de démarcation nette entre la masse des érythocytes et le plasma encore très riche en globules rouges et polynucléaires.

Cette colonne de plasma transvasée subit une seconde sédimentation simple jusqu'au moment où les globules rouges forment au fond du tube un dépôt à contours nets. Le surnageant où toute coloration rosée a disparu est riche en leucocytes et le pourcentage des petits lymphocytes y est généralement de plus de 80 %. Il est rare qu'une troisième sédimentation soit nécessaire pour obtenir une concentration en petits lymphocytes d'au moins 70 %, pourcentage minimum exigé comme nous l'avons dit

Selon le résultat de la numération, le nombre absolu de petits lymphocytes est ajusté à 4×10^6/ml par concentration ou dilution avec du plasma natif acellulaire. La préparation ainsi obtenue est diluée avec un volume triple de milieu de culture TC 199 (DIFCO) et additionnée d'une dose de tuberculine brute correspondant à 200 unités de tuberculine par ml de culture. (0,20 ml de tuberculine brute diluée à 1/10 par ml de culture). Chaque expérience de stimulation comporte 4 cultures et une culture témoin (sans adjonction de tuberculine) de 2,5ml chacune. Toutes les opérations sont terminées en une journée.

Nous n'employons donc aucun artifice de sédimentation et n'ajoutons aucun antibiotique aux cultures.

Après 120 heures d'étuve à 37 °, on fait sur tous les tubes une numération des éléments blancs, puis le culot de centrifugation est étalé, coloré au MAY GRUNDWALD Giemsa et examiné soigneusement à l'aveugle. Le frottis est divisé dans le sens de la longueur, depuis son origine jusqu'à son extrimité, en 4 compartiments égaux, numérotés de I à IV et pour chaque frottis, la lecture de 500 éléments dans les compartiments II et IV permet d'établir un pourcentage précis, bien reproductible, des lymphocytes non transformés, des différentes formes de transformation incomplète des petits lymphocytes, des lymphoblastes typiques et des cellules en mitose. Sans compter la culture témoin, c'est donc au total 4 000 éléments mononucléés qui sont examinés pour chaque expérience de stimulation.

Nous utilisons donc pour la lecture une méthode simple, uniquement morphologique.

CHAPITRE III

RESULTATS DE LA STIMULATION DES LYMPHOCYTES IN VITRO PAR L'ANTIGENE TUBERCULINIQUE.

De multiples travaux prouvent que les lymphocytes cultivés in vitro en présence de tuberculine se transforment avec une augmentation du nombre des mitoses, formation de lymphoblastes et de cellules intermédiaires chez des sujets antérieurement sensibilisés à la tuberculine.

En témoignent les résultats suivants :

- COWLING (15) en 1963, avec des méthodes d'appréciation morphologiques et isotopiques des résultats.

L'auteur compare d'abord l'action de la PHA et de la tuberculine brute (dilution 1/4 000) sur des cultures des 3 à 7 jours.

Les sujets 1 à 4 ont des réactions cutanées positives à la tuberculine brute ; les sujets 5 à 8 ont des réactions négatives.

Les +++ indiquent que les cellules prennent la coloration à l'acide périodique de SCHIFF, témoin de la charge en glycogène des cellules.

TABLEAU N° VII

CASES		PHYTOHEMAGGLUTININE			TUBERCULINE	
		1er j.	3ème j.	7ème j.	3ème j.	7ème j.
1	% Blastes	15	50	82	5	18
	% cellules +++	6	2	0	1	6
2	% blastes	16	20	53	1	11
	% cellules +++	9	3	3	0	6
3	% blastes	9	59	90	1	10
	% cellules +++	5	1	0	2	3
4	% blastes	4	79	97	1	20
	% cellules +++	20	7	0	14	4
5	% blastes	2	57	76	0	0
	% cellules +++	6	5	1	0	0
6	% blastes	7	43	83	0	0,5
	% cellules +++	24	16	12	1	1
7	% blastes	6	77	88	0	1
	% cellules +++	12	7	3	4	0
8	% blastes	8	73	92	0	0
	% cellules +++	15	5	0	0	0

L'auteur compare ensuite les résultats après 3 et 7 jours, à une culture témoin de TC 199, chez les mêmes sujets en utilisant une méthode autoradiographique.

D'après COWLING (15) ainsi que le suivant.

TABLEAU N° VIII

Cas n°		Après 3 jours			Après 7 jours		
		199	PHA	Tuberculine	199	PHA	Tuberculine
1	% blastes	0	59	5	0	82	18
	% incorporation thymidine	0	43	4	0,5	9	5
2	% blastes	1	23	1	1	53	11
	% incorpor. thymidine	1	18	3	1	2	4
3	% blastes	0	59	1	1	90	10
	% incorpor. thymidine	0	25	0,5	1	4	3
5	% blastes	0	57	0	1	76	0
	% incorpor. thymidine	0	34	0	0,5	3	0
6	% blastes	0	43	0	1	83	0,5
	% incorp. thymidine	0	36	0	0,5	7	0
7	% blastes	0	73	0	0	92	0
	% incorpor. thymidine		-	0	0,5	-	1

On voit dès ces premiers résultats :

- que se confirme la réalité de la transformation blastique
- que cette transformation blastique est différente dans le temps et l'importance pour la PHA et la tuberculine.
- qu'il existe une différence nette entre les réponses des sujets MANTOUX + et MANTOUX négatif.
- qu'il existe une corrélation entre les méthodes d'appréciation morphologiques et les méthodes isotopiques.

SCHNECK en 1963 (48)

étudie les effets d'une purification de la suspension des leucocytes par passage à travers de la laine de verre.

Les résultats avant et après purification chez un sujet MANTOUX + sont résumés dans le tableau suivant : (IX) p. 26.

TABLEAU IX

SUSPENSION	TEMPS D'INCUBATION	REACTIF	Nb de cellules viables				
			lympho.	granulo.	mono.	Macro.	blast
SUSPENSION 573	1 Heure	aucun	266	x	x	0	0
	7 jours	aucun	62	x	x	41	0
	7 jours	PPD	121	x	x	2	35
SUSPENSION 872	1 Heure	aucun	224	254	14	0	0
Avant purification.	1 Heure	aucun	251	7	0	0	0
Après purification.	5 jours	aucun	108	0	0	0	0
	5 jours	PPD	85	0	0	0	6
	5 jours	PHA	90	0	0	0	13
	8 jours	PPD	106	0	0	0	7

D'après SCHRECK (40) Effet de la tuberculine PPD (20 γ/ml) et de la PHA (10 mg/ml) sur une suspension de cellules de sang humain normal et après passage à travers la laine de verre.

Ces résultats confirment les faits précédents et montrent que les lymphocytes semblent se transformer de façon moins active si le plasma a été filtré.

ASPEGREN (2) étudie plus particulièrement les mitoses produites par la tuberculine chez des sujets sensibilisés ou non. Tableau X page 27.

- Pourcentage de mitose en culture de lymphocytes avec de la tuberculine brute OT (5500u/ml) chez 20 sujets de 17 à 62 ans dont l'ID de 0,1ml de tuberculine 5UI/ml (dilution 1/2 000) a produit une infiltration d'au moins 10mm de diamètre en 48 à 72 hs.

SUJETS	TUBERCULINE 1/2 000	MILIEU SAUTON	PHA
1	2,0	0	2,0
2	1,0	0	2,5
3	0,5	0	2,0
4	2,5	0	3,0
5	0	0	6,0
6	0,5	0	3,0
7	0	0	2,0
8	1,5	0	3,0
9	2	0	3,0
10	0	0	2,5
11	0	0	4,0
12	1,5	0	6,0
13	0	0	3,5
14	3,5	0	4,0
15	2,0	0	1,5
16	0	0	1,0
17	1	0	1,5
18	0,5	0	4,5
19	4,5	0	1,5
20	4,0	0	1,5

Tableau X -

D'après ASPEGREN ainsi que le suivant.

% de mitose chez des sujets négatifs à la tuberculine :

SUJETS	TUBERCULINE	MILIEU DE SAUTON	PHA
1	0	0	3,5
2	0	0	3,0
3	0	0	3,5
4	0,3	0	3,0
5	0	0	2,5
6	0,5 vacciné par BCG	0	7
7	0,5	0	1,5
8	0	0	2,5
9	1,0	0	2
10	0	0	1,5

Tableau n° XI -

D'après ces résultats, Aspegren pense que l'élévation du nombre des mitoses sous l'influence de la tuberculine in vitro n'est pas assez régulière pour être prise comme méthode d'appréciation de l'allergie tuberculinique.

ZWEIMAN (50-51) étudie chez le cobaye sensibilisé et non sensibilisé à la vieille tuberculine l'action de la PHA et de la vieille tuberculine sur les mitoses des lymphocytes - lecture à 90 heures : Tableau XII et XIII page 25

TABLEAU N° XII

- Mitoses / 1000 cellules. Animaux non sensibilisés :

Animal No	PHA	OT	Control.
1	39	0	1,5
2	22	0	0,5
3	11	0,3	0
4	37	0,2	0,5
5	20	0	0
6	33	0	0

- Mitoses pour 1000 cellules. Animaux scorbutiques sensibilisés à la tuberculine mais avec tests intradermiques négatifs.

No	PHA	OT	Control.
18	57	8	0
19	96	10	0
20	10	16	0
21	43	14	0
22	36	11	1
23	46	2	0

TABLEAU N° XIII -

La sensibilisation à la tuberculine chez le cobaye est obtenue par une injection préalable d'adjuvant complet de FREUND. Les cobayes soumis à des tests intradermiques à la tuberculine après injection d'adjuvant de FREUND mais mis à un régime carencé en vitamines C ont des réactions cutanées très faibles alors que l'on voit qu'ils ont un nombre de mitoses en culture nettement supérieur à celui d'animaux non sensibilisés à la tuberculine.

MATSANIOTIS (38) chez les jeunes enfants obtient les résultats suivants :

SUJETS	STIMULUS	AGE	Nbs Observ.	Ns cas avec mitose > 0,4%	Ns Mitoses/100 cellules	
					Extreme	Moyenne
Tuberculino négatifs :						
- Sélectionnés	OT	2 à 18 mois	100	23	0,40-200	0,94
- Vacciné BCG	OT	5 à 14 mois	13	11	0,40-450	1,42
Tuberculino-positifs :						
- Sans antécédent tuberc.	OT	5 à 17 mois	9	8	0,65-194	1,33
- Vaccinés BCG	OT	9 à 17 mois	8	7	120-450	2,32
- Tuberculose active	OT	3 à 12 mois	10	4	0,45-2,50	1,38
- Healing tuberculose	OT	3 à 12	3	3	1,82-2,90	2,41
	PHA	2 à 18 mois	70	70	0,87-7,22	3,38

TABLEAU N° XIV -

Pourcentage de mitose induite dans des cultures stimulées par la tuberculine et la PHA chez des enfants MANTOUX + et MANTOUX -

COWLING et QUAGLINO (13) en 1965 avec des méthodes morphologiques ont obtenu les résultats suivants : Tableau XV.

SUJETS	STIMULANTS	TYPES DE CELLULES	Nb de cellules en culture après			
			24h	48h	72h	96h
1	Vieille Tuberculine	- leucocytes	1275	935	563	557
		- lymphocytes	371	268	361	535
		- cellules lympho-blastiques	0	9	12	14
		- mitoses	0	0	0	0
2	Vieille Tuberculine	- leucocytes	1275	1081	881	800
		- lymphocytes	776	887	797	552
		- cellules lympho-blastiques	0	44	26	56
		- mitoses	0	0	0	0

TABLEAU XV -

Enfin, utilisant les méthodes isotopiques de rétention de thymidine tritiée, mesurée par comptage dans un compteur à scintillation,

CARON obtient les résultats suivants : tableau XVI et fig. 4 p. 33. (7-8)

Moyenne des désintégrations par minute (DPM) de 3 cultures de lymphocytes contenant 3,55 x 10⁶ lymphocytes par culture provenant d'un sujet MANTOUX +, cultivées 7 jours avec les substances indiquées et incubées la dernière heure de la culture avec 0,625 MC/ml de thymidine tritiées :

PPD Mg/ml	0	0,025	0,05	0,625	1,25	2,5	0
PHA/Mg/ml	0	0	0	0	0	0	0,025
DPM	78	4 300	14 100	287 400	364 00017		537,60

TABLEAU N° XVI

HARTOG (22) en 1967, utilise la rétention de thymidine C14

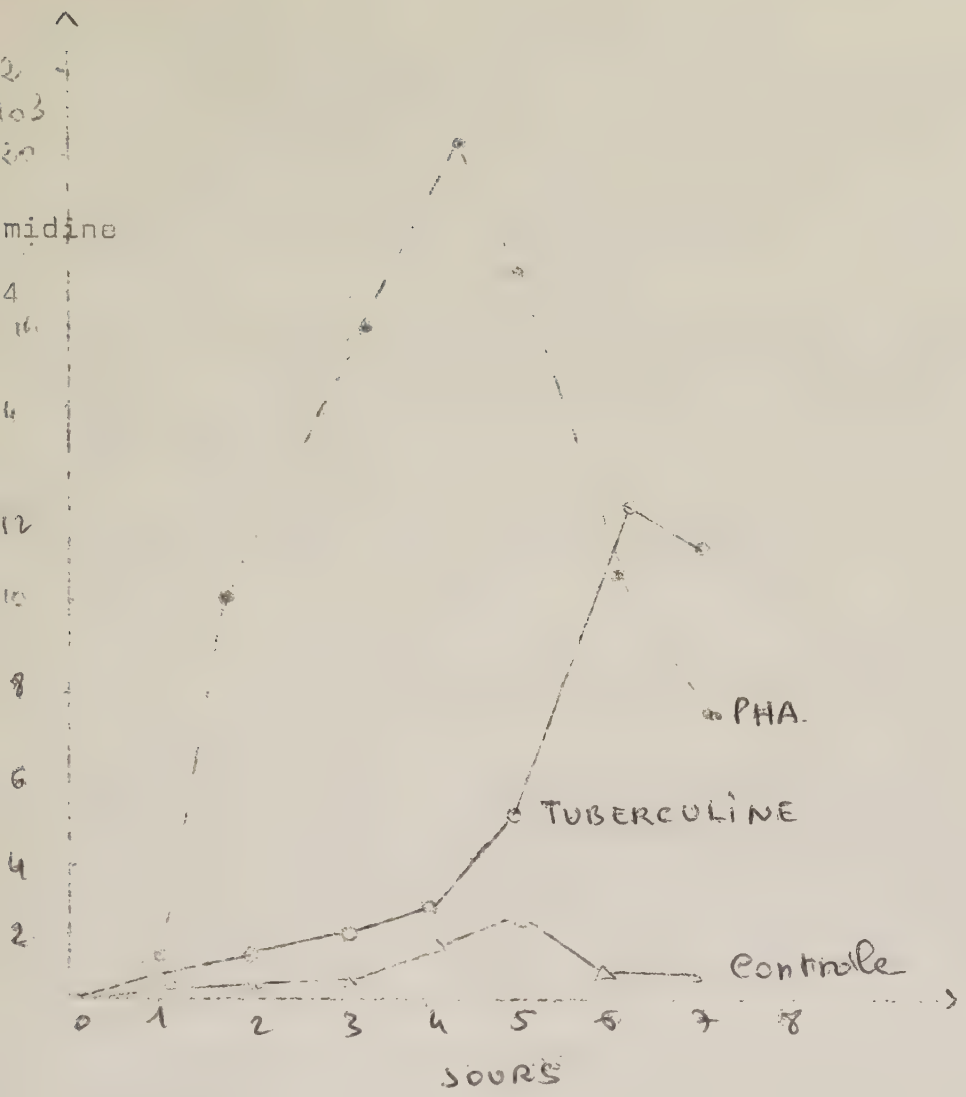
- La rétention est exprimée en pourcentage de l'activité totale apportée.

- La rétention moyenne de 22 cultures non stimulées est de 0,96 %.

- La rétention moyenne de 24 cultures stimulées par la PHA, est de 19,5 %.

- Tandis que la rétention moyenne de II cultures stimulées par le PPD provenant de 7 sujets dont les tests cutanés sont fortement positifs à la tuberculine, a été de 20 %.

Nous donnerons nos propres résultats au chapitre de la comparaison entre les tests cutanés et les expériences de stimulation.



Radioactivité de cultures de lymphocytes humains provenant d'un sujet fortement MANTOUX $\frac{+}{1/100}$ au 7ème jour.

DPM = désintégration par minute.

D'après CARON (8) fig.4.

CHAPITRE IV

RAPPORTS ENTRE LES TESTS CUTANÉS TUBERCULINIQUES ET LA STIMULATION IN VITRO DES LYMPHOCYTES PAR LA TUBERCULINE.

Dans la première partie de notre travail, nous avons analysé les différents aspects de la transformation in vitro des lymphocytes en présence de tuberculine.

Nous avons vu que les chercheurs sont d'accord pour accorder à ce phénomène, un caractère immunologique spécifique et que dès lors, la transformation blastique en présence de tuberculine entre dans le cadre des réactions allergiques d'hypersensibilité de type retardées.

Envisageons maintenant plus précisément les rapports qui peuvent exister entre les réactions in vitro et les réactions cutanées à la tuberculine.

1 - CONCEPTION ACTUELLE DE L'ALLERGIE TUBERCULINIQUE.

La résistance de l'organisme à l'infection tuberculeuse est, comme on le sait, une immunité de surinfection. Cette immunité s'accompagne d'un état d'allergie. Il existe en effet des réactions cutanées différentes avec l'extrait protéique de BK (tuberculine); selon que l'organisme a été antérieurement en rapport ou non avec le bacille tuberculeux. Cette réponse, différente chez le sujet sensibilisé antérieurement, est la définition même d'un état allergique.

L'immunité vis à vis de la tuberculose est actuellement une donnée statistique, et les réactions cutanées n'explorent que l'allergie tuberculinique, sans préjuger d'une notion quantitative d'efficacité.

LANDSTEINER et CHASE ont montré qu'on pouvait transmettre l'hypersensibilité retardée à la tuberculine chez l'homme par l'injection de lymphocytes de donneurs sensibilisés.

Jusqu'alors, tous les expérimentateurs s'étaient heurtés à l'impossibilité de transmettre passivement l'hypersensibilité tuberculeuse car il n'y a pas d'anticorps circulant dans la tuberculose.

Ainsi est apparu pour la première fois, le rôle des lymphocytes comme cellules immunologiques compétentes, médiateur cellulaire de l'hypersensibilité de type retardé, notamment tuberculiniqu

On conçoit dès lors, que de nombreux chercheurs ont tenté d'établir des corrélations précises qualitatives, et surtout quantitatives entre les réactions cutanées à la tuberculinique, et la transformation in vitro, des lymphocytes cultivés avec cette tuberculine.

II - TECHNIQUE DES TESTS CUTANES A LA TUBERCULINE

A) Les différentes tuberculines

Nous avons vu lors des expériences de stimulation in vitro utiliser deux types de tuberculine : la tuberculine brute, ou vieille tuberculine, (OT) et la tuberculine purifiée.

La pratique des tests cutanés se fait également avec ces mêmes tuberculines.

Il n'y a pas de correspondance exacte d'unité à unité, entre les différents types de tuberculine.

- La tuberculine brute ou old tuberculine, des auteurs anglo-saxons, est obtenue à partir des cultures de bacilles tuberculeux. Elle représente le produit soluble endocellulaire extrait des germes au moyen de facteurs modifiant la perméabilité cellulaire.
Ce liquide contenant de nombreux composants, est donc, de grande complexité chimique. Il contient entre autre, des protéines du milieu de culture, qui peuvent être à l'origine d'erreurs d'interprétation.

Pour ces raisons, on a fabriqué des tuberculines purifiées cristallisées, plus spécifiques et plus actives que la tuberculine brute.

Les plus couramment utilisées sont pour les tests de stimulation et les réactions cutanées, la tuberculine PPD (tuberculine chauffée et purifiée par l'acide trichloracétique) et la tuberculine purifiée IP 48 (obtenue par précipitation par l'acide salicylique et l'alcool à 95°.

B) Technique des tests cutanés

a) - Les méthodes purement qualitatives

(Cuti-réaction de VON PIRQUET - timbre tuberculinique à la tuberculine concentrée ou fraîche - intradermo - réaction finlandaise de TRAUSTI).

Elles ne sont pas suffisamment précises et ne donnent pas de résultats assez reproductibles pour être utilisées comme base d'appréciation de l'allergie tuberculinique cutanée.

En effet, quelque soit la valeur de la technique de pratique de ces tests, il reste qu'on ignore toujours la quantité exacte de tuberculine injectée.

b) - Les tests quantitatifs

L'intradermo-réaction de MANTOUX est utilisée par la totalité des auteurs pour l'appréciation de l'allergie tuberculinique cutanée.

Elle consiste injection rigoureusement intra-dermique de 1/10 de millilitre d'une solution de tuberculine produisant une papule de 8 millimètres de diamètre.

Les auteurs utilisent pour ces réactions intra-dermiques soit des dilutions de tuberculine brute, soit de la tuberculine purifiée soit enfin différents antigènes tuberculiniques provenant de diverses mycobactéries.

La même tuberculine est généralement utilisée pour les tests intra-dermiques et les réactions de stimulation lymphoblastique.

1 - Le lieu de l'injection intra-dermique est, chez l'homme, la face antérieure de l'avant-bras ; chez le cobaye, le dos de la patte.

2 - Techniquesde l'intra-dermo réaction :
Elles varient quant aux concentrations de tuberculine employée.

- Avec la vieille tuberculine :

Deux concentrations sont généralement utilisées :
5 unités internationales par 1/10 de ml, et 100 unités 1 par ml,
Le volume injecté restant le même, c'est-à-dire de 1/10 de millilitre.

- Avec la tuberculine purifiée :

→ La tuberculine PPD

La plupart des auteurs utilisent, sous un volume de 1/10 de millilitre, deux concentrations :
- 5 unités internationales soit 0,1 γg de PPD.
- 250 unités internationales soit 5 γg de PPD.

- HUGES utilise des doses différentes chez l'homme :
- 0,2 γg et 2 γg de PPD.

- ZWEIMAN chez le cobaye, utilise la première concentration de PPD, soit 1 UI/ 1/10ml.

→ La tuberculine IP 48

Elle est utilisée à trois dosages : 2, 10, et 50 unités, sous un volume de 1/10 de millilitre.

c) Lectures des résultats :

1 - On sait que pour obtenir la plus grande précision possible, il est recommandé de répéter à plusieurs reprises la lecture des tests.

Les réactions précoces entre la 8ème et la 10ème heure, sont dénuées de toute valeur spécifique, et ne seront pas retenues.

Seules sont valables les lectures à la 48ème et à la 72ème h.

2 - Dans les expériences de corrélation entre les tests cutanés et la stimulation lymphoblastique .

La plupart des auteurs préconisent une lecture des deux résultats à la 48ème heure (KERDY, GUMP, MAC FARLAND) et à la 72ème heure. ZWEIMAN, chez le cobaye, lit les résultats plus précocement entre la 24ème heure et la 48ème heure.

D'autres, tels COWLING (13) et CHAPARAS (9) font la lecture des tests à la 72ème heure.

3 - Les critères d'appréciation des résultats :
Les méthodes d'appréciation visuelles uniquement subjectives sont rejetées. Les auteurs mesurent les dimensions de l'infiltration cutanée exprimée par la moyenne entre deux diamètres perpendiculaires.

Sont considérées comme négatives, les réactions donnant une induration inférieure à 5mm de diamètre.

En cas de négativité avec la première concentration de tuberculine, les sujets sont testés à nouveau avec une concentration supérieure.

d) Sélections des sujets

Les études comparatives intradermiques et de stimulation, ont été faites sur différents échantillons de population, sujets sains MANTOUX positifs, sujets sains MANTOUX négatifs, sujets tuberculeux, enfin sujets jeunes, âgés ou atteints de divers états pathologiques. Nous nous contenterons d'abord de donner et d'analyser les résultats comparés chez des sujets sains. Nous verrons ailleurs les incidences des divers états physiologiques ou pathologiques.

III - C) EVOLUTION DES REACTIONS CUTANEES A LA TUBERCULINE EN FONCTION DE L'AGE.

Dans une thèse récente, notre ami GOUJARD (20) a fait une étude de la sensibilité tuberculinique cutanée chez des sujets âgés.

Il constate, tant dans son expérimentation personnelle portant sur 533 sujets âgés que chez la majorité des auteurs s'intéressant au problème, une diminution plus ou moins importante mais toujours manifeste de l'intensité des réactions tuberculiniques en fonction de l'âge.

Cette diminution de l'allergie cutanée tuberculinique peut aller jusqu'à la négativation complète des réactions cutanées.

Le tableau suivant XVII montre les pourcentages des sujets anergiques dans différentes transches d'âge chez divers auteurs.

Il est à noter que tous les résultats ne sont pas toujours exactement comparables, le type de tuberculine et les doses utilisées n'étant pas toujours les mêmes.

- KAYNES, WELLS, ARONSON, CANETTI, (20) utilisent une dilution de tuberculine brute au 1/100ème.

- COLLAS, COURY utilisent de la tuberculine IP 48 à 50 unités.

TABLEAU XVII

AUTEURS	0-15	16-29	40-49	50-59	60-69	70-79	80 et +
COURY & COLL	-	-	26	32	38	35	40
CANETTI	-	12	2,5	6	12	14	12,5
COLLAS & COLL	-	-	0	0	0,5	1,5	3
KAYNE	49	17	7	15	14	-	-
WELLS & COLL	46	11	0	3,6	7,3	-	-
ARONSON	70	25	11,5	12,5	12,5	22	-
Moyenne	55	16	9	11,5	14	18	18,5

Il apparait toutefois une augmentation du pourcentage de l'anergie quand l'âge augmente quelque soit la technique.

En prenant les chiffres des moyennes, on obtient la courbe de répartition des sujets négatifs selon l'âge.

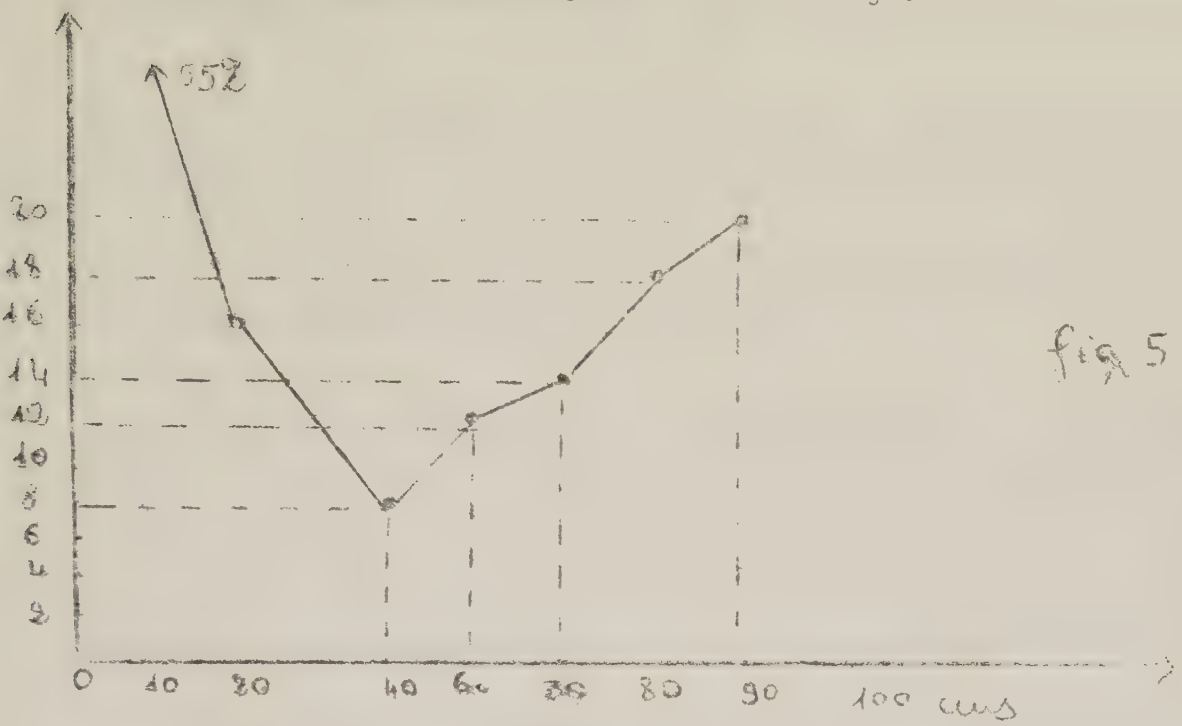


fig 5

Les nombreux paramètres pouvant avoir une incidence sur cette baisse de l'allergie cutanée ont été ensuite examinés : sexe, état, de réactivité de la peau, état nutritionnel des sujets, conditions de vie et par là, fréquence supposée des contacts tuberculeux, existence d'une tuberculose active.

Aucun de ces facteurs n'a pu être retenu comme élément déterminant de la baisse de l'allergie et l'auteur conclut qu'il n'existe pas actuellement d'explication formelle satisfaisante au phénomène. La sénescence des processus immunologiques de défense sont le plus fréquemment invoqués.

IV.- NOTRE TECHNIQUE DES TESTS INTRADERMIQUES

Les tests intra-dermiques à la tuberculine ont été faits, soit quelques jours après, soit au moins trois mois avant (en ce cas, généralement 1 an avant) le prélèvement de sang par la stimulation in vitro. L'exploration de la sensibilité cutanée à la tuberculine est faite d'abord par l'injection intra-dermique de 2 unités de tuberculine purifiée 1P 48, sous le volume de 0,1ml, puis de 50 unités du même produit et sous un volume identique. La réaction locale est lue après 48 heures et 72 heures, seule étant retenue la réaction la plus forte.

On été notées :

a) Les dimensions de l'infiltrat cutané exprimé par la moyenne entre deux diamètres perpendiculaires.

b) Les dimensions du halo érythémateux autour de l'infiltrat.

c) La qualité de la réponse cutanée selon la classification de EDWARDS et PALMER.

Les infiltrats de plus de 1 mm de diamètre se trouvaient généralement dans les types I et II de cette classification, ceux du moins de 10mm appartenaient presque toujours au type III ou IV, ceux de moins de 5mm étaient considérés comme négatifs.

V - RESULTATS DES COMPARAISONS ENTRE TESTS CUTANES ET TRANSFORMATION IN VITRO.

1 - Dès les premiers travaux, il est apparu qu'il n'y avait de transformation des lymphocytes que si le sujet avait été antérieurement sensibilisé à l'antigène avec lequel les lymphocytes sont cultivés.

- Pour la tuberculine, on s'est aperçu également que les résultats de la stimulation des lymphocytes dépendaient, avant tout, de l'état immunologique du sujet.

- Quelques soient les méthodes d'appréciation des résultats des expériences de stimulation , on remarquait un pourcentage de mitoses, de forme blastique ou d'incorporation d'éléments radioactifs aux cellules, moins important chez les sujets MANTOUX négatifs que chez les sujets MANTOUX positifs.

- Ainsi était mis en évidence une grossière relation qualitative entre les réactions cutanées et la transformation lymphoblastique par la tuberculine.

- De nombreux auteurs se sont alors attachés à déterminer des relations plus précises, quantitatives, entre ces deux phénomènes, avec l'espoir d'obtenir avec les réactions de stimulation, une nouvelle méthode d'appréciation de l'allergie tuberculinique, méthode plus précise, car faisant appel aux éléments cellulaires dépositaires de la mémoire immunologique, chargée de reconnaître l'antigène spécifique et apte à réagir à son contact.

2 - Les premiers en 1965, MAC FARLAND & HEILMAN (36) tentent une étude quantitative du phénomène.

Ils comparent chez 21 donneurs sains ou malades ambulatoires sans tuberculose active, l'état des réactions cutanées et les résultats des expériences de stimulation faites avec différents antigènes mycobactériens, c'est-à-dire avec des tuberculines préparées à partir de différentes espèces de mycobactéries :

- PPDS - PPDB - PPDY - PPDScotochromogène - PPD phei

Il y a comparaison entre le diamètre des réactions cutanées en millimètres produit par l'injection de 5 UI de l'AG tuberculinique et le pourcentage de blastes et de mitoses après 96 heures de culture.

Les résultats obtenus sont les suivants :

TABLEAU XVIII

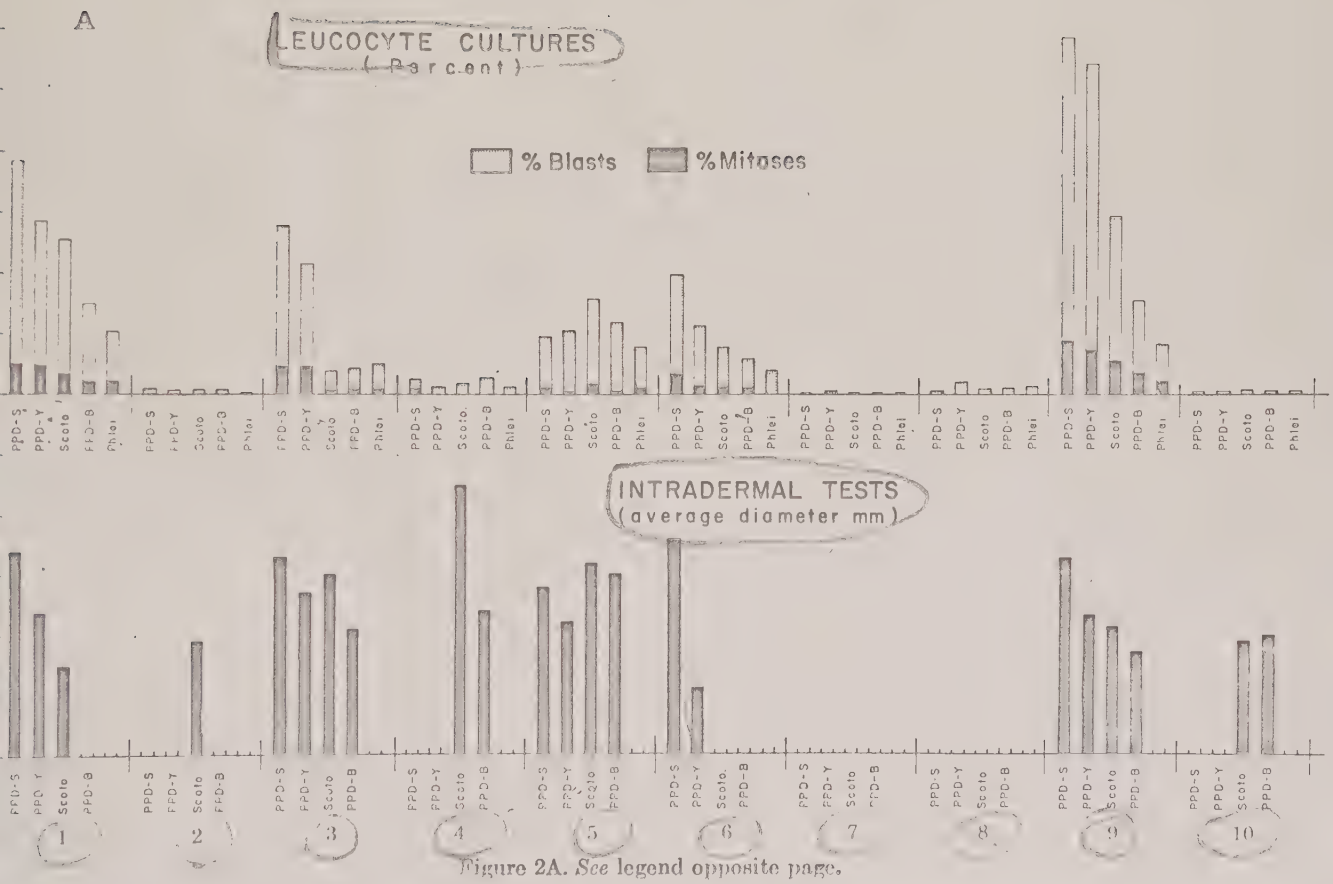
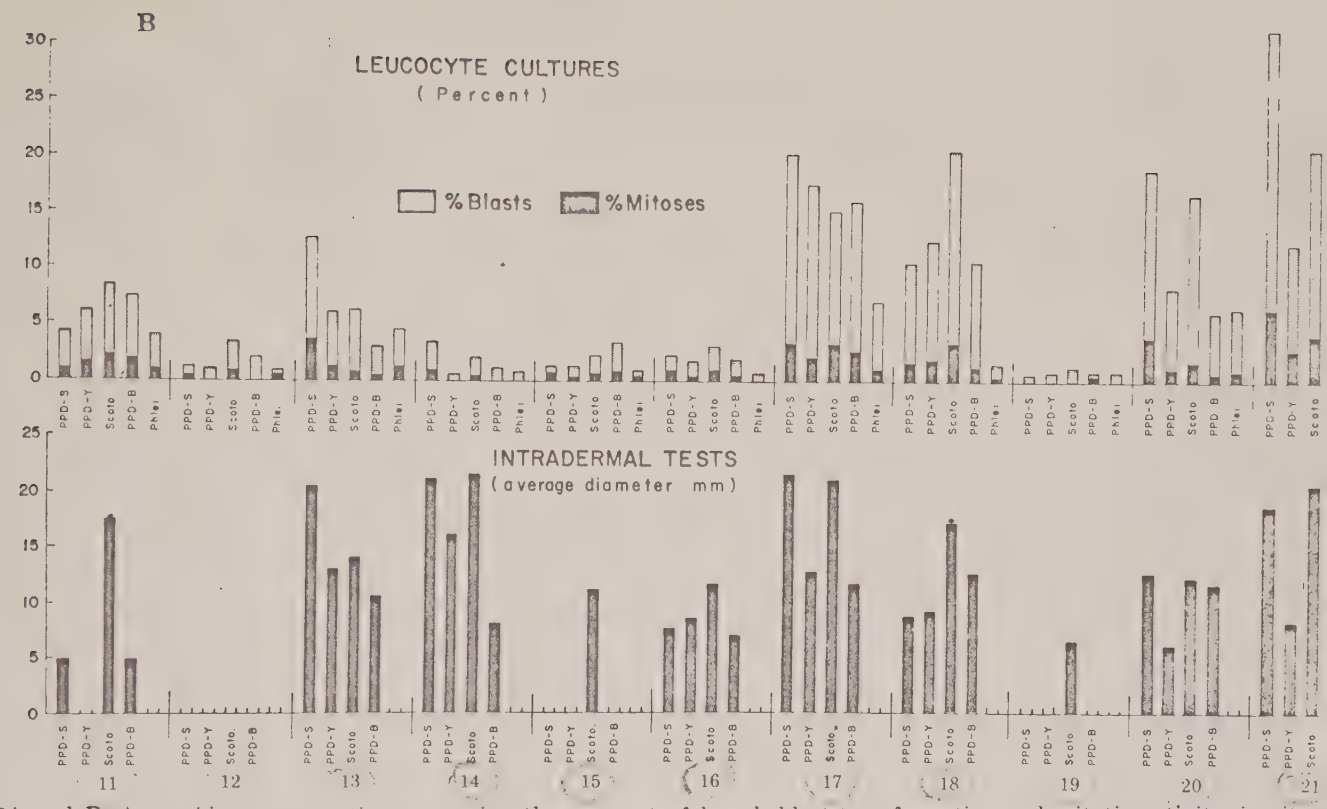


Figure 2A. *See* legend opposite page.

TABLEAU XIX



g. 2A and B. A graphic representation comparing the per cent of lymphoblast transformation and mitotic activity *in vitro* dermal tests in 21 donors and ambulatory patients. With the exception of the phlei antigen, the same mycobacterial extra l to the cultures.were used for intradermal tests. Intradermal tests with less than 5 mm of induration were regarded as nega

Les tableaux XVIII et XIX comparent le pourcentage de lymphoblastes et de mitoses in vitro avec le résultat des tests intradermiques chez 21 donneurs et malades ambulatoires.

- Les valeurs des cultures de contrôle ne sont pas représentés car le pourcentage de blastes et de mitoses est négligeable.

- La présence de 1 % ou plus de cellules transformées, est arbitrairement considéré comme significative.

- Les donneurs 1, 6 et 9 sont âgés de 50 ans et plus, et n'ont jamais eu d'histoire tuberculeuse. Il y a une bonne corrélation dans les deux tests, surtout avec la tuberculine PPDS. Leurs leucocytes montrent une activité décroissante avec les autres antigènes en culture.

- Le donneur 2 a une faible réaction dermique au PPDS scoto, et ne réagit pas avec cet antigène in vitro.
De même, le donneur 10, qui a une petite réactivité dermique avec le PPDS scoto et PPDB ne réagit pas in vitro.

- Le donneur 3 a une corrélation partielle entre les deux tests, mais avec une plus forte réactivité au PPDS dans les deux cas.

- Les résultats des cultures de lymphocytes des donneurs 5, 11 et 18 suggèrent fortement à l'auteur, une infection avec un microorganisme en parenté antigénique avec le scotochromogène utilisé pour préparer l'antigène.

- Les donneurs 7 et 8 ont des réactions négatives dans les 2 cas.

- Seul le donneur 12 réagit in vitro, mais pas en ID (des tests ultérieurs n'ont pu être faits).

- Les donneurs 14, 17, 20 et 21 évoquent la possibilité d'une double infection avec le bacille tuberculeux, et une mycobactérie atypique en parenté antigénique avec le scotochromogène.

- Le donneur 14 est un ancien tuberculeux ; nous verrons plus loin les problèmes qu'il pose.

Au total, il apparait malgré tout une grossière corrélation entre la taille de la réaction cutanée, et le degré in vitro de transformation blastique.

Cette étude utilisant divers antigènes mycobactériens, pourrait être également utile pour détecter une exposition antérieure à des mycobactéries autres que le BK.

3 - En 1968 KERBY (29) reprend le problème chez 114 sujets, 52 sujets sains et 62 sujets ayant une tuberculose active.

Nous ne donnerons ici, fig. 6 et 7 que les résultats concernant les sujets sains ; les autres résultats, concernant les tuberculeux, seront reproduits plus loin.

- Les sujets sont testés intradermiquement avec la tuberculine PPDS 5 UT. Ceux, négatifs à cette dose, sont retestés à 250 UT. On mesure le diamètre moyen à 48 heures.

- La culture de lymphocytes est lue par méthode autoradiographique avec la thymidine titrée.

- On soustrait le pourcentage de cellules transformées dans les cultures de contrôle de celui trouvé avec les cultures stimulées par la tuberculine PPDS.

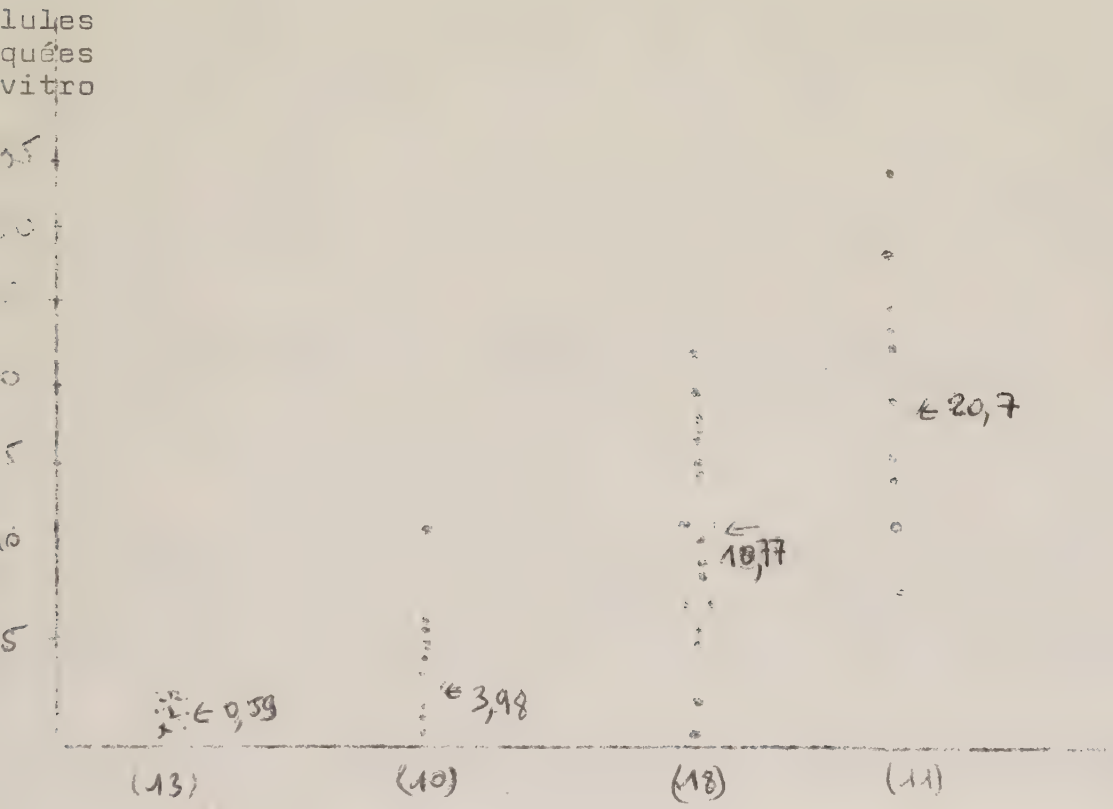


fig.6

PPD (250 UT) négatif

PPD (5UT négatif) mais positif à 250 UT

PPD (5UT) positif

REACTIONS CUTANEES A LA TUBERCULINE PPDS en mm.

← Valeur moyenne pour chaque groupe.

Relation entre l'importance de la transformation blastique et les réactions cutanées.:

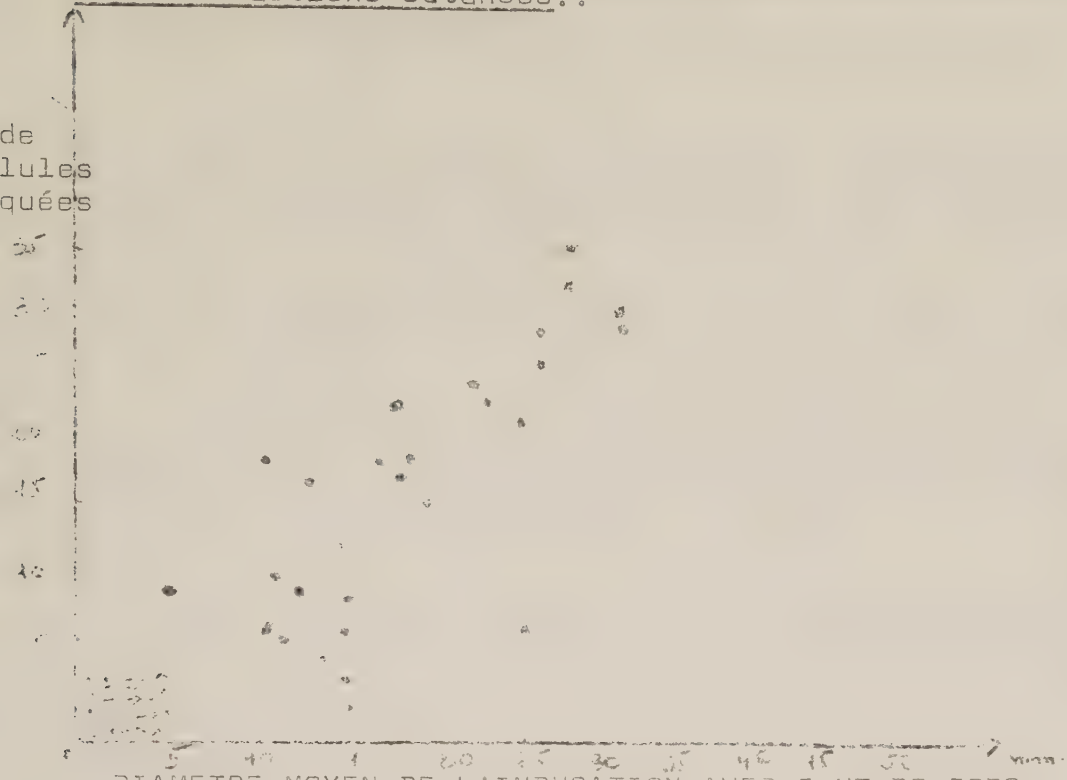


fig.7

(une relation linéaire entre le log de la dose de tuberculine et le diamètre moyen de l'induration a été montré. Sur cette base, on a fait une estimation théorique de la réponse, à 5 UT de PPD chez le sujets ayant une réponse positive à 250 unités. Elles sont représentées par une astérisque, et reliées à leur valeur d'origine).

Dans le groupe des 52 sujets sains, il existe une corrélation significative entre la transformation blastique et le diamètre moyen de la réaction tuberculinique.

4 - Cependant, les résultats de GUAP (21) en 1967, viennent en opposition avec les résultats précédents : il étudie, chez 31 sujets l'état des réactions cutanées à la tuberculine PPD et le pourcentage d'incorporation de thymidine titrée par autoradiographie.:

II sujets sains MANTOUX nég.
II sujets sains MANTOUX +
9 sujets tuberculeux en traitement MANTOUX +

Nous avons déjà vu, à propos des sujets sains, que l'auteur ne trouvait aucune corrélation entre la quantité d'antigènes tuberculinique et la réponse lymphocytaire. Ce fait est retrouvé également chez les sujets MANTOUX nég. et chez les tuberculeux.

La prolifération montre une réponse moyenne égale dans les deux groupes avec réactions cutanées positives.

Cette réponse est environ 9 fois plus élevée que chez les non-réacteurs. La différence est significative, cependant, il existe 35 % de réponses faussement négatives in vitro. Les résultats faussement positifs sont rares.

Les résultats sont groupés dans le diagramme suivant :

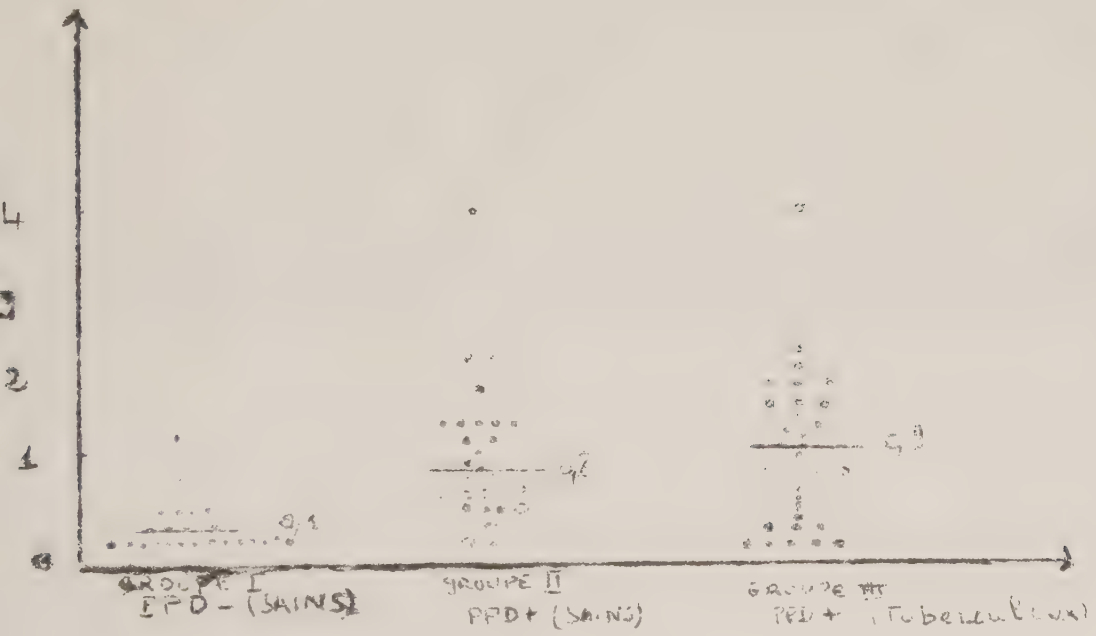


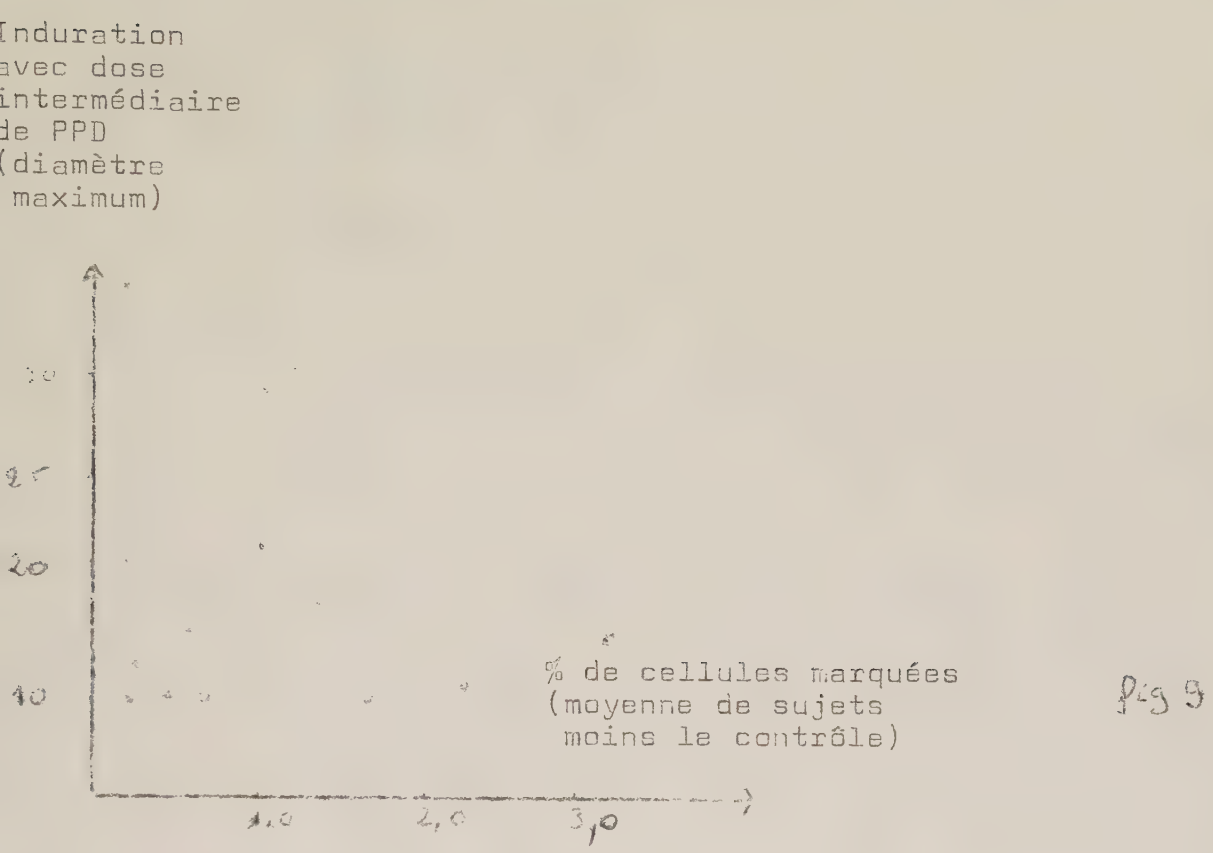
Fig.8

. Sujets réagissant à 1 de PPD 50 UT

. Sujets réagissant à 5 de PPD 250 UT

– Moyenne

La comparaison entre les réactions cutanées, en millimètre, et le pourcentage d'incorporation chez des sujets réagissant à une dose de PPD de 5 UT. donne les résultats suivants :



Il n'existe donc pas de corrélation.

L'auteur conclut en disant que l'éventualité d'une réponse faussement négative en culture, limite la portée de la technique de culture des lymphocytes comme moyen de mesure, in vitro, de l'hypersensibilité retardée à la tuberculine.

5 - Nos résultats

Les résultats que nous avons obtenus chez les 208 sujets âgés, de la Fondation ROTSCHILD, sont les suivants : (3') Tabl. XX et XXI - Fig. 10

Tableau XX - Réactions tuberculiniques, sexe et âge des 208 personnes étudiées.

	Diamètre de l'infiltrat			AGE		
	Nombre %	extrêmes	Moyennes	Hommes Nb %	extrêmes	moyenne
Réaction + 2 unités						
Phlycténulaire	4	15-20	16,5	0/4	78-91	84,0
Inflammatoire	6 21,6	5-35	15,8	1/6 22,2	79-92	85,2
Intense						
Autre	35	5-28	11,9	9/35	66-108	79,2
Réaction + 10 U	28 13,5	5-20	6,71	3/28 10,7	58-94	80,0
Réaction + 50 U	25 12,0	5-20	8,71	1/25 4,0	66-90	80,6
Réaction douteuse à 50 U	33 15,9	0-4	—	3/33 9,1	66-95	77,9
Réaction négative à 50 U	77 37,0	0	—	14/77 18,2	61-98	82,5
Total	208 100,0			31/208 14,9	58-108	80,3

Réactions lymphocytaires à la tuberculine et allergie cutanée :

TABLEAU XXI

LYMPHOBYTES INCOMPLETEMENT TRANSFORMES			LYMPHOBLASTES			MITOSES			NUMERATION après 120		
Extrêmes	Moy	± SD	Ext.	Moy	±SD	Ext	Moy	±SD			
REACTION TUBERCULINIQUE CUTANEE											
Positive à 2 unités phlycténulaire											
0,00-1,66	0,70	1,52	8,65-31,11	19,06	9,66	0,00-0,50	0,22	0,49			
- non phlycténulaire											
0,00-5,17	0,55	1,29	0,30-29,10	14,19	3,12	0,00-1,64	0,11	0,26			
Positive à 10 unités											
0,00-4,17	0,39	0,93	2,47-22,63	8,90	4,66	0,00-0,66	0,06	0,13			
Positive à 50 unités											
0,00-8,12	0,61	1,67	0,05-13,22	6,67	3,37	0,00-0,13	0,02	0,04			
Douteuse à 50 unités											
0,00-6,15	1,39	1,66	0,00-11,20	1,48	2,14	0,00-0,15	0,01	0,06			
Négative à 50 unités											
0,00-6,15	0,99	1,23	0,00-18,35	0,41	2,12	0,00-0,27	0,00	-			
Culture témoin non stimulée											
0,00-6,90	0,30	-	0,00-0,60	0,004	-	0,00	-	-			

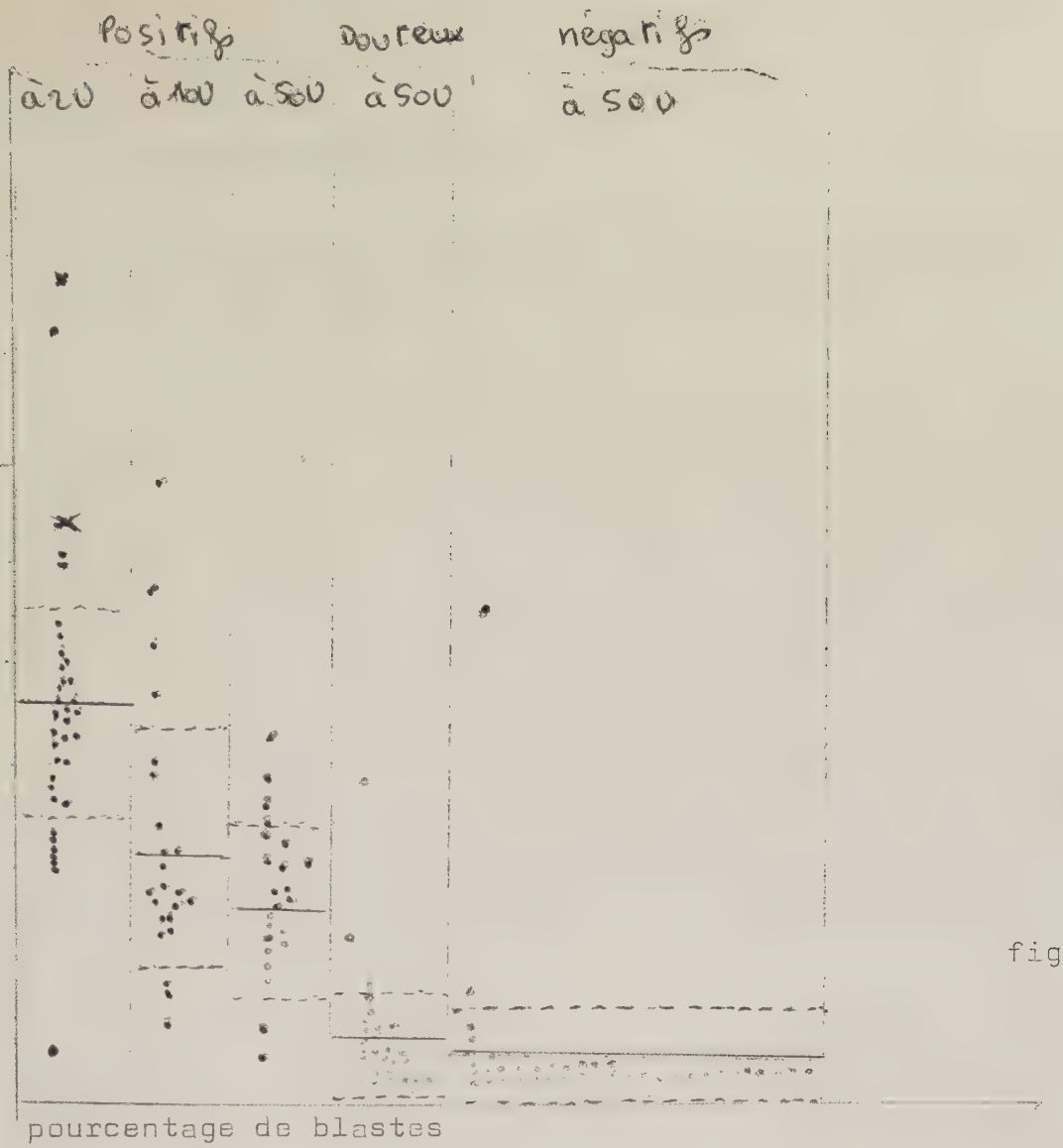


fig. 16

Pourcentage de blastes selon le degré de sensibilité cutanée à la tuberculine.

a) - Sélection des sujets :

Suivant leur sensibilité cutanée à la tuberculine, les 208 sujets explorés se répartissent en 5 catégories, de la façon suivante (tableau XV) :

a) Quarante cinq sujets ont réagi à 2 unités de tuberculine par un infiltrat net et quelquefois considérable, atteignant jusqu'à 35mm de diamètre. Dans 4 cas, l'infiltrat de plus de 15mm de diamètre était centré d'une phlyctène. Dans 6 autres cas, il était entouré d'un halo érythémateux très étendu mesurant plus de 40mm. Les réponses cutanées dans ce groupe étaient dans l'ensemble, très fortes puisque sur les 45 sujets, 32 ont présenté des infiltrats de 10mm de diamètre au moins, alors que 13 autres seulement offraient des papules de moins de 10mm. La moyenne générale des diamètres de l'infiltrat est dans ce groupe de 12,78mm.

b) Vingt-huit personnes chez qui le test à deux unités était négatif, ont répondu à l'injection intradermique de 10 unités. Les réactions étaient incomparablement moins fortes que chez les sujets de la catégorie précédente. Aucune réaction phlycténulaire ou entourée d'une auréole érythémateuse importante n'a été observée et 8 fois seulement (sur 28) l'infiltrat mesurait plus de 10mm de diamètre. Aussi, la moyenne générale du diamètre de l'infiltrat n'est-elle ici que de 6,71mm.

c) La catégorie correspondant à une allergie cutanée encore plus faible, n'apparaissant qu'avec l'injection de 50 unités de tuberculine, est représentée par un effectif de 25 personnes. Comme dans la catégorie précédente, les réactions très intenses, phlycténulaires ou fortement inflammatoires, étaient absentes et les diamètres de l'infiltrat de plus de 10mm observés chez 9 sujets (sur 25). La moyenne générale du diamètre de l'infiltrat, 8,71mm, est ici, encore modeste quoique légèrement supérieure à celle du groupe précédent.

d) Nous avons réuni dans un ensemble à part 33 personnes dont les réactions à 50 unités de tuberculine, sans pouvoir être considérées comme positives, n'étaient cependant pas nulles. Elles se présentaient, en effet, quelquefois comme des infiltrats indiscutables, mais d'un diamètre inférieur à 5mm et toujours difficiles à délimiter avec précision, se classant par conséquent dans le type IV de EDWARD & PALMER. Ailleurs, aucune infiltration n'était perceptible, et seul un érythème était visible pendant la durée de l'observation.

Ces 33 réactions douteuses comportaient 3 cas de petites papules, 3 réactions arythémateuses intenses et 27 réactions superficielles de moindre importance.

e) La catégorie dont l'effectif est le plus fourni comprend enfin 77 personnes qui n'ont présenté aucune réaction à l'injection de 50 unités de tuberculine. Il est évident que parmi ces sujets, un certain nombre aurait montré des réactions positives à des doses supérieures de tuberculine. Toutefois, l'exploration de l'allergie cutanée jusqu'à 50 unités était suffisante pour les besoins du présent travail, nous considérons comme tuberculo-négatifs ceux qui ne réagissent pas à l'innoculation de cette dose.

Il convient de préciser que l'importance numérique de ces

différentes catégories, au sein desquelles la sensibilité tuberculinique des sujets qui les composent est grossièrement comparable, ne reflète nullement la répartition réelle du pourcentage des réactions, depuis les plus fortes jusqu'aux réactions négatives, que l'on dénombre en étudiant systématiquement l'allergie cutanée dans une population de personnes âgées. Les 208 sujets étudiés ici réunissent en nombre sensiblement égal des tuberculino-positifs (47,1 % au total, dont 21,6 %, 13,5 % et 12,0 % réagissant respectivement à 2, 10, et 50 unités) et des tuberculino-négatifs (52,9 % au total dont 15,9 % de réactions douteuses et 37 % de réactions négatives à 50 unités). Les sujets aux réactions douteuses ou négatives à l'innoculation de 50 unités de tuberculine sont nettement en excès par rapport à leur proportion dans la population de personnes âgées dont ils proviennent (30,7 % au total, dont 9,9 % de réactions douteuses et 20,8 % de réactions nulles sur un total de 650 personnes systématiquement explorées). Le choix a été fait délibérément de cette façon afin de pouvoir étudier de plus près la signification des réponses évanescentes ou négatives du vieillard. De même, la répartition selon l'âge ou le sexe n'est pas identique dans cette sélection à ce qu'elle est dans la population générale (à forte prédominance féminine) étudiée par nous : la proportion des sujets masculins est faible, et la moyenne d'âge de 80 ans environ (tableaux).

Ajoutons que les personnes étudiées ici étaient exemptes de toute affection ou thérapeutique susceptible de modifier l'aptitude des lymphocytes à subir une transformation in vitro, ainsi qu'en attestait leur réponse à la phytohémagglutinine. L'examen radiologique des poumons a mis en évidence des calcifications chez de nombreuses personnes, quelle que fût leur sensibilité à la tuber[illegible]. Chez 4 patientes, on retrouvait des antécédents de tuberculose pulmonaire guérie au moment de l'examen. Une autre malade présentait des lésions de tuberculose cutanée en évolution.

b) - Stimulation lymphocytaire par la tuberculine in vitro

Nous rapporterons successivement les observations faites sur les cultures lymphocytaires dans les 5 catégories de patients à sensibilité tuberculinique décroissante ; puis nous comparerons entre eux les résultats pour chacune de ces catégories, notamment dans le but d'apprécier leur signification statistique ; enfin nous rechercherons la fréquence et la nature des discordances entre les données de l'exploration cutanée de l'allergie, et l'aptitude des lymphocytes à se transformer in vitro au contact de la tuberculine.

1°/ - Les résultats concernant les pourcentages des lymphocyte transformés, des lymphoblastes, des mitoses, ainsi que la numératio des leucocytes dans les cultures de 120 h stimulées par la tuberculine, sont réunis dans le tableau N°I.

Les lymphoblastes typiques, facilement reconnaissables à la taille de l'élément cellulaire, à l'aspect de la chromatine, à la présence de nucléoles et aux particularités tinctoriales du cytoplasme, fournissent le critère d'appréciation le plus distinct (fig.I). En dépit de la dispersion des pourcentages des blastes, dans chaque catégorie définie par une allergie cutanée comparable, le taux de transformation blastique est très différent selon la catégorie envisagée, et diminue régulièrement avec l'augmentation de la quantité de tuberculine nécessaire pour provoquer une réponse cutanée. Parmi les sujets qui réagissent à l'injection de 2 unités de tuberculine, la différence est encore nette entre ceux dont la réaction est phlycténulaire et ceux qui réagissent sous forme d'infiltrat avec ou sans zone inflammatoire superficielle intense.

La moyenne du pourcentage des blastes dans l'ensemble des sujets de cette catégorie qui est de 14,47 %, atteint 19,06 % chez les personnes dont l'infiltrat est centré par une phyctène. On peut dire schématiquement, qu'un pourcentage de blastes supérieur à 10 % traduit une forte sensibilité tuberculinique, entre 5 et 10 %, il correspond à une allergie faible, au-dessous de 5 %, il s'accompagne d'une réaction cutanée douteuse à 50 unités, alors que la négativité complète des réponses à cette dose va généralement de pair avec une absence totale de lymphoblastes dans les cultures.

Si l'on considère les éléments cellulaires en mitose dans les cultures lymphocytaires de 120 h qui n'ont subi aucun artifice technique visant à en accroître le nombre, les résultats sont encore très nets. De 0,22 % dans les réactions phlycténulaires et de 0,12 % dans les réactions tuberculiniques fortes, on passe par paliers successifs à une absence totale de mitoses chez les sujets qui réagissent faiblement ou pas du tout à l'inoculation intradermique . Cependant, le pourcentage des figures en mitose est constamment très bas (1,64 % dans le cas le plus démonstratif) et n'est pas toujours parallèle à l'importance de la prolifération blastique.

Il n'est pas sans intérêt d'étudier également les éléments cellulaires morphologiquement intermédiaires entre les petits lymphocytes non transformés et les lymphoblastes parfaitement évolués. Contrairement à ce que l'on observe pour les blastes et les mitoses, les lymphocytes incomplètement transformés ne diminuent pas en nombre parallèlement à l'affaiblissement de l'allergie cutanée. Bien au contraire, la tendance semble se dessiner plutôt en sens inverse : le pourcentage moyen des formes intermédiaires est respectivement de 0,57 et de 0,39 % chez les sujets qui réagissent à 2 et à 10 unités de tuberculine, et il passe à 0,61 chez ceux qui réagissent seulement à 50 unités, atteint 1,39 % chez ceux dont la réaction à cette dose est douteuse et reste encore voisin de 1 % chez les sujets qui ne réagissent pas. Ces moyennes traduisent bien ce qui apparait souvent à l'étude de cas individuels : les cultures où la prolifération blastique et mitotique est la plus intense, ne contiennent généralement pas de cellules classées dans les stades intermédiaires de transformation et, quand il en existe, leur nombre est négligeable par rapport à celui des blastes ; par contre, dans les cultures où le pourcentage des lymphoblastes est inférieur à 5 %, il est assez fréquent de rencontrer les formes intermédiaires en quantité plus grande (jusqu'à 8 %). Il arrive même qu'en l'absence de toute figure blastique ou mitotique, seules ces formes de transition en nombre nettement plus grand que dans les cultures témoin non stimulées témoignent d'une certaine sensibilité des lymphocytes vis-à-vis de la tuberculine.

Quant au nombre absolu des leucocytes comptés dans les cultures de 120 heures, il ne semble dépendre ni de l'intensité des réactions cutanées, ni de l'aptitude des lymphocytes à se transformer au contact de la tuberculine. Le rapport entre le nombre de leucocytes trouvé après incubation et le nombre de leucocytes au début de la culture est partout de l'ordre de 0,6 et ne subit pas de fluctuation parallèle aux résultats des tests tuberculiniques in vivo ou in vitro. De même, l'index de transformation (produit de ce rapport et du pourcentage de transformation blastique) proposé par COULSON et CHALMERS ne modifie pas les conclusions que l'on peut tirer de la seule prolifération blastique des

lymphocytes en culture.

2°/ - Les constatations qui viennent d'être faites doivent être authentifiées et précisées par la recherche de leur signification statistique. Il s'agit de savoir si l'intensité de la prolifération lymphocytaire in vitro est réellement différente entre les diverses catégories de sujets dont la sensibilité dermique est comparable, et si au sein de chacune de ces catégories il existe une corrélation étroite entre l'importance de la réponse cutanée et le pourcentage de lymphocytes transformés. L'étude ne portera que sur le taux des lymphoblastes parce que les formes mitotiques et les lymphocytes incomplètement transformés sont en nombre trop faible et surtout, présentent une distribution trop irrégulière pour se prêter aisément à des calculs statistiques valables.

Malgré la grande dispersion des chiffres qui sont représentés dans les cases de la figure [illegible], malgré la déviation évidente de quelques points qui s'écartent notablement de la norme, l'évaluation statistique prouve que les différences sont significatives et, presque toujours, à un seuil très bas comme le montre le tableau [illegible].

Corrélations entre les réactions cutanées et le taux des lymphoblastes.

TABLEAU XXII

Catégories des réactions cutanées comparées	test	signification
Phlyctène à 2 U X Réaction non-phlyctène à 2 U.	t=2,35	P<0,05
Réaction non phlyctène à 2 U. X Réaction à 10U.	t=5,65	P<0,001
Réaction à 10 U. X Réaction à 50 U.....	t=1,97	P>0,05
Réaction à 50 U X Réaction douteuse à 50 U.....	t=7,15	P<0,001
Réaction douteuse à 50 U X Réaction nég. à 50U.	t=2,41	P<0,02
Réaction négative à 50 U X Culture non stimulée		non signific

Il est à noter que la transformation blastique chez les sujets qui réagissent à 10 ou à 50 unités de tuberculine ne diffère qu'au seuil de 5/100. Des différences plus significatives sont notées entre les autres groupes. C'est ainsi que les sujets dont la réaction à 50 unités est qualifiée de douteuse ont un taux de transformation blastique nettement supérieur à celui que l'on observe chez les sujets qui ne réagissent pas et dont les cultures lymphocytaires ne se distinguent plus des cultures témoins non stimulées. Les plus fortes lignes de démarcation ($P < 0,001$) se situent entre les sujets qui réagissent à 2 unités et ceux qui réagissent à 10 unités, puis entre les sujets sensibles à 50 unités et ceux dont les réactions à cette dose sont douteuses ou nulles. Parmi les sujets qui réagissent à 2 unités, une distinction nette peut encore être établie entre les réactions phlycténulaires et celles qui ne le sont pas : malgré le petit nombre des réactions phlycténulaires (4 cas) la différence est significative à un seuil inférieur à 5 %. La réaction érythémateuse intense entourant un infiltrat provoqué par 2 unités de tuberculine n'a pas la même signification que la phlyctène et ne s'accompagne pas d'une transformation blastique particulièrement remarquable.

L'examen des cultures lymphocytaires permet donc, au même titre que l'exploration de la sensibilité cutanée, d'établir un classement net entre divers groupes de réactions : intenses, moyennes faibles et nulles. La concordance entre les deux modes de recherche ne va pas plus loin. Il nous a été, en effet, impossible de démontrer au sein de chaque groupe un parallélisme entre les dimensions de l'infiltrat cutané et le taux de transformation blastique, le coefficient de corrélation terme à terme étant constamment dépourvu de signification.

3°/ - Sur la figure IV, une dizaine de points se situent bien en dehors et généralement au-dessus des chiffres moyens de la case correspondante, traduisant une certaine discordance entre l'intensité de la transformation blastique et la réaction cutanée. Dans la plupart des cas, cette discordance est sans réelle gravité, car les sujets dont le taux de transformation semble trop élevé présentaient des réactions cutanées à la limite de la positivité à des doses de tuberculine plus faibles et pourraient être admis dans une catégorie de sensibilité tuberculinique supérieure à celle dans laquelle, par souci de rigueur, ils ont été classés. Deux points sont cependant, très nettement aberrants et méritent une mention spéciale.

Dans un premier cas (transformation blastique infime avec une réaction cutanée à 2 unités) il s'agissait d'une malade atteinte de lupus tuberculeux traité avec succès par l'isoniazide d'Avril 1968 à Octobre 1969. Le tableau ci-dessous montre l'évolution de ses réactions cutanées et des cultures lymphocytaires.

Evolution des réactions tuberculiniques et de la transformation lymphocytaire chez Mme M....

TABLEAU XXIII

E	Allergie cutanée à la tuberculine		Culture lymphocytaire + tuberculine			
	2 unités	10 unités	Lymphocytes Transformés %	BLASTES %	MITOSES %	Nb de Leucocytes
anvier 68	Infiltrat 35mm et réaction superficielle intense	---------	-----	-----	-----	---
eptembre 68	---------	---------	0,00	0,25	0,00	620
anvier 69	---------	---------	0,05	0,30	0,00	600
oût 69	Réaction érythémateuse	Infiltrat 7mm	---	---	---	---
ars 70	---------	---------	0,00	20,40	0,15	650

Précisons que la réponse des lymphocytes de cette patiente à la phytohémagglutinine in vitro est demeurée normale lors de chaque expérience. Au cours de l'évolution d'une tuberculose cutanée, nous avons donc assisté à la disparition totale et spécifique, mais transitoire de la sensibilité à la tuberculine des lymphocytes du sang circulant, sensibilité pleinement restituée après guérison alors que les réactions allergiques de la peau s'étaient manifestement atténués.

Une situation inverse (transformation blastique intense avec l'absence d'allergie cutanée) s'est présenté chez un autre malade. Il s'agissait d'un grabataire âgé de 86 ans, porteur d'une sonde vésicale à demeure pour hypertrophie prostatique inopérable et infection rebelle à tout traitement. Les résultats des examens successifs apparaissent dans le tableau XXIV. Chez ce grand infecté et dénutri chronique, emporté par une infection saisonnière intercurrente cinq jours après le dernier examen, la stimulation des lymphocytes par la tuberculine a donc toujours été très forte, alors que la réaction cutanée, déjà faible en Mars, est devenue nulle en quelques mois.

Signalons enfin, que chez les anciens tuberculeux guéris depuis longtemps (6 cas) aucune discordance importante n'a été relevée entre les réponses cutanées et lymphocytaires.

Evolution des réactions tuberculiniques cutanées et des cultures lymphocytaires de M.S...

DATE	Réactions cutanées à la tuberculine		Culture lymphocytaire + tuberculine			
	10 unités	50 unités	Lymphocytes transformés %	BLASTES %	MITOSE %	Nb de Leucocytes
Février 69	------	--------	0,66	19,53	0,54	600
Mars 69	Négative	Infiltrat 5mm	----	-----	----	----
Septembre 69	------	--------	0,00	15,17	0,10	650
Novembre 69	Négative	Négative	----	------	----	----
Décembre 69	------	--------	0,25	18,35	0,27	600

CHAPITRE V

DISCUSSION

Il n'est pas douteux que l'acquisition d'une allergie tuberculinique donne lieu à une transformation lymphoblastique, lorsque les lymphocytes de sujets sensibilisés, sont cultivés en présence de tuberculine.

Les travaux de nombreux auteurs, COWLING (12-13-14-15-43) COULSON et CHALMERS, PEARMAIN & LYCETTE, etc...l'ont démontré de façon indiscutable, quoique sur un nombre très limité de cas.

Les travaux expérimentaux sur les animaux, de ZEIMAN (50-51) notamment, montrent également que les lymphocytes de cobayes modifient leur capacité de réaction in vitro vis-à-vis de la tuberculine, selon que les cobayes sont sensibilisés ou non vis-à-vis de la tuberculine par l'adjuvant complet de FREUND et indépendamment d'une carence en vitamines C.

Ceci dit, il apparait une grande diversité de résultats, qui, manifestement, ne peuvent s'expliquer que par les techniques utilisées souvent assez différentes. C'est ce point particulier que nous discuterons en premier :

I - Préparation des lymphocytes :

Le premier problème qui se pose, est celui de la chronologie entre le moment de la pratique des tests cutanés, et du prélèvement sanguin.

Nous avons vu que presque tous les auteurs effectuaient leurs prélèvements sanguins avant d'étudier les réactions cutanées à la tuberculine. Seul ZEIMAN chez le cobaye, effectue le prélèvement sanguin 48 heures après la lecture des tests.

Dans notre propre expérience, nous avons également fait des tests cutanés après la ponction veineuse, sauf dans quelques cas où nous avons fait les tests environ 1 an avant les expériences de stimulation.

Il n'existe pas d'étude précise étudiant les conséquences des différentes chronologies. Cependant, il ne semble pas, à priori, impossible que l'introduction récente de l'antigène tuberculinique dans l'organisme puisse modifier les réactions lymphocytaires puisque le délai de sensibilisation des lymphocytes in vivo est peu connu.

II - La séparation du plasma et de la masse des érythocytes est sujette, nous l'avons vu, à de nombreuses variations techniques.

Certains auteurs, dont nous sommes, étant partisan d'une sédimentation simple, d'autres accélérant cette sédimentation par des artifices physiques ou chimiques.

- L'artifice consistant à filtrer le plasma à travers de la laine de verre (SCHRECK (48) ou des filtres de nylon (GUMP) (21) dans le but de purifier la suspension en retenant les granulocytes, les monocytes et les macrophages semble être à l'origine de modifications importantes dans les résultats et expliquerait peut-être en partie les résultats de GUMP (p.45).

Si l'on examine l'étude de SCHRECK (p.27) d'une culture faite avant et après purification, on note une diminution importante des formes blastiques, 35 % et 7 %; selon que la préparation ait été ou non purifiée et surtout selon qu'il y ait ou non présence de macrophage dans la préparation. Les lymphocytes semblent se transformer de façon moins active quand la préparation a été filtré

Nous avons vu que GUMP (p.45) trouvait une réponse in vitro neuf fois plus élevée chez les sujets MANTOUX positifs que chez les sujets MANTOUX négatifs, mais qu'il obtenait 35 % de réactions faussement négatives in vitro et que de ce fait, il n'y avait pas de corrélation significative entre les réactions cutanées et la transformation des lymphocytes in vitro. Le fait d'avoir filtré la suspension qui entraîne une diminution de la transformation des lymphocytes est probablement pour quelque chose dans cette fréquence de 35 % de résultats faussement négatifs.

- Le fait d'ajouter au plasma des substances chimiques, carbonate de fer, ou cellulose méthylée (COULSON et CHALMERS) (11-12) pour accélérer la sédimentation et purifier la suspension qui contient jusqu'à 99 % de lymphocytes ne semble cependant pas entraîner une fréquence particulière de résultats faussement négatifs. L'existence par contre, dans les cultures non stimulées de formes blastiques oblige ces auteurs à utiliser un index de réponse tenant compte de ce fait.

La centrifugation du sang ou l'adjonction de substance macromoléculaire de type Dextran pour accélérer la sédimentation ne semble pas, par contre, avoir de conséquences particulières.

-III - La densité leucocytaire de la suspension est comme nous l'avons vu assez variable selon les travaux, mais toujours de l'ordre du million de cellules par millilitre de plasma ou de culture. Aucune étude particulière n'a été faite étudiant ce paramètre et son incidence sur les résultats. Cette concentration leucocytaire a été choisie ce façon relativement arbitraire et suivie par tous les auteurs.

Quant à la composition de la suspension, nous avons déjà vu qu'une purification trop importante de celle-ci, avec présence presque exclusive de lymphocytes, surtout en cas de filtration semblait diminuer la capacité de transformation des lymphocytes. La présence d'autres cellules, notamment de macrophages, même en faible quantité semble nécessaire à la transformation lymphoblastique.

Il semble en effet, actuellement acquis que la présence des macrophages est indispensable à la transmission du message antigénique aux lymphocytes thymodépendant.

CARON, avec une suspension contenant 29 % de polynucléaires et 71 % de lymphocytes, a une bonne corrélation entre les réactions cutanées et la transformation lymphocytaire, alors que GUMP, avec 95 % de lymphocytes, obtient une corrélation, mais avec 35 % de réponses faussement négatives.

Il semble que 70 % de lymphocytes en suspension, soit nécessaire et suffisant pour obtenir une bonne transformation in vitro.

IV - Les milieux nutritifs utilisés, sont presque toujours les mêmes TC 199-TC 109, ou un mélange TC 199 - sérum de veau. La pratique de cultures de contrôle systématiquement couplées avec les cultures stimulées, montrent que ces milieux nutritifs n'ont aucune influence spécifique sur la transformation lymphoblastique.

L'introduction par de nombreux auteurs, dans les milieux de culture de pénicilline et de streptomycine, pourrait éventuellement faire évoquer une action non spécifique de la part de ces antibiotiques, d'autant qu'à aucun moment, il n'a été fait d'étude parallèle de la sensibilité des sujets testés à ces antibiotiques ; et l'on sait que chez des sujets allergiques à la pénicilline, une culture de leurs lymphocytes avec celle-ci, provoque une transformation blastique en cas d'allergie.

Cependant, la pratique de culture de contrôle permet, là aussi, d'éliminer ce facteur comme cause d'erreur.

MATSANIOTIS (38) a particulièrement examiné ce problème en étudiant le nombre des mitoses dans des cultures non stimulées avec et sans antibiotique, et il conclut que la présence d'antibiotiques n'entraîne aucune différence significative, dans le nombre des mitoses. Mais il faut signaler que le nombre des mitoses obtenu en culture, est toujours très faible, et que sur 24 sujets examinés : en présence de Pénicilline et de Streptomycine, il trouve dans 11 cas, un faible pourcentage de mitoses, alors que dans des cultures sans antibiotique, 7 cas seulement avaient un faible pourcentage de mitose.

V - Qualité et Quantité de tuberculine.

Si nous mettons à part, le cas des expériences de GUMP (p.45) (qui ne trouve aucune correlation entre la quantité de tuberculine PPD adjointe au milieu, et le pourcentage de cellules marquées, comptées par autoradiographie. fait peut-être en rapport, comme nous l'avons vu plus haut, avec une purification trop poussée de la suspension lymphocytaire) nous avons vu que la grande majorité des auteurs trouvent une dose optimale de tuberculine au-dessous et au-dessus de laquelle la réponse blastique est réduite.

Le fait qui frappe, est la grande diversité des doses de tuberculine employées qui peuvent donner une transformation blastique et des mitoses.

- Avec la vieille tuberculine, la dilution optimale donnant le maximum de formes blastiques, est de 1/25.000 (COWLING, QUAGLINO Or COWLING lui-même, en 1963, utilise une dilution de 1/4.000 de OT, et obtient un certain pourcentage de formes blastiques, à 3 jours, légèrement inférieur cependant à celui de QUAGLINO utilisant la dilution de 1/25.000.

Il semble également, que la dilution donnant le maximum de formes blastiques n'est pas la même que celle donnant le maximum de mitoses. ASPEGREN (12) et MATSUMOTOS (38) comptent les mitoses et utilisent une dilution de tuberculine brute de 1/2.000. Cette dilution de 1/2.000, donne des transformations blastiques moins importantes qu'une dilution de 1/25.000. Il devient donc difficile de comparer des résultats donnant des pourcentages de mitoses avec ceux donnant des pourcentages de blastes. On ne trouve d'ailleurs pas, dans nos documents, d'étude donnant une dilution optimale de tuberculine en fonction des mitoses.

- Les doses de tuberculine purifiée PPD utilisées, apparaissent ici encore, très variées.

D'après la courbe de COULSON et CHALMERS (11) (p.) donnant la dose optimale en fonction des indices corrigés, la meilleure concentration est une dose de 250 unités de PPD/ml, soit 5γ .

Pour CARON (7-8) appréciant l'incorporation de thymidine titrée, la dose optimale de tuberculine PPD est de 1,25 soit 62,5 unités internationales/ml.

CHAPARAS(9) utilisant également une méthode isotopique, obtient le maximum de cpm (coups par minute) avec une dose de tuberculine de 50γ /ml de PPD. soit 2.500 unités internationales.

Pour HARTOG (22) cette dose est de 25γ .

Même chez des auteurs utilisant des méthodes de lectures tout à fait comparables, il apparait une différence énorme dans les doses optimales de tuberculine (CARON, CHAPARAS) (7-8-9).

Le fait que la transformation blastique in vitro, soit fonction de la quantité d'antigène tuberculinique étant acquis, il devient difficile de comparer les divers résultats, même dans les travaux utilisant des méthodes de culture et de lectures pratiquement identiques.

Cependant, lorsqu'on examine la courbe de HARTOG (p.) étudiant le pourcentage de rétention de thymidine, en fonction de diverses concentrations de tuberculine PPD, et en fonction de l'allergie cutanée, on note que si c'est pour une concentration de tuberculine PPD de 25γ/ml, que la répartition des sujets en fonction de leur allergie est la meilleure , pour une dose 10 fois plus faible, la différence de rétention de thymidine par les cultures de sujets allergiques ou anergiques, apparait encore.

VI - Durée de la culture :

Nous avons déjà vu (p.1[illegible]) que l'activité mitotique et blastique en culture, ne se manifeste pas avant la 72ème heure en présence de tuberculine.

Le moment de la lecture des résultats, quelques soient ses modalités, est l'objet de variations importantes selon les auteurs : de 90 heures de culture, considéré comme le moment optimal, par COULSON et CHALMERS, on passe à 120 heures pour SCHRECK et CHAPARAS, et même à 168 heures pour CARON.

Si l'on se réfère aux travaux de COULSON et CHALMERS, qui seuls étudient cet aspect du problème, on constate qu'il y a tout d'abord une diminution importante du nombre des cellules - (nombre total) en culture, en fonction de la durée de celle-ci : De 2000 cellules au temps Zéro, il n'en reste plus que 575 à la 100ème heure. Le nombre de petits lymphocytes diminue également, dans des proportions identiques : 1996,T=0 ; 515,T= 100 heures.

Le nombre de mitoses et de blastes augmente à partir de 60 heures, et atteint un maximum à la 100ème heure. Ces auteurs considèrent, que 90 heures est le moment optimum d'observation, et n'étudient plus de façon identique, l'évolution des cellules après 100 heures, moment de lecture le plus couramment employé dans la plupart des travaux.

Il semble cependant, (p.1[illegible]) qu'après 90 heures, le nombre total de cellules en culture, ne diminue plus de façon aussi importan et que le pourcentage de cellules transformées, continue d'augmenter de façon relativement faible.

Des divergences importantes dans les résultats des divers travaux, peuvent donc être en partie liés, au moment choisi pour la lecture, et ne peuvent être valablement comparés, que les résultats lus au même moment.

VII - Méthodes delecture :

Deux types de méthodes sont utilisés pour la lecture des résultats : les méthodes morphologiques, et les méthodes isptopiques. Ces méthodes sont elles équivalentes ? sont elles aussi précises les unes que les autres pour apprécier la transformation cellulaire ? C'est cet aspect du problème que nous allons discuter maintenant.

- Examinons d'abord les méthodes morphologiques :

  - Estimation du nombre des mitoses sur lame.

  - Estimation du nombre de lymphoblastes sur lame ;

Le fait constant est le faible pourcentage de mitoses obtenues par stimulation antigénique, comme le montrent les résultats d'ASPEGREN, (2) de ZWEIMAN (50-51) et de KRAVIS (30).

- Avec la PHA, en comparant les travaux de COWLING (13-14-15) (p.24-25) et ceux d'ASPEGREN (p.24) on note qu'au 7ème jour de culture, le pourcentage de mitoses est environ 20 à 30 fois moins élevé que le pourcentage de blastes.

Cette différence quantitative importante apparait également avec la tuberculine et chez des sujets sensibilisés, le pourcentage de mitoses est toujours très faible, en regard du pourcentage de blastes au même jour de culture.

Il existe cependant une différence significative entre les pourcentages de mitoses obtenues par la stimulation non spécifique, avec la PHA, et par stimulation avec la tuberculine.

Dans les cultures stimulées par la tuberculine chez des sujets sensibilisés et non sensibilisés, les pourcentages moyens des mitoses sont, certes, plus élevés chez les sujets allergiques que chez les sujets anallergiques, mais cette différence est relativement faible bien que significative ; alors que si l'on évalue le nombre de formes blastiques, il apparait une différence très nette entre les deux états.

COWLING et QUAGLINO (15),chez deux sujets MANTOUX + (ce qui ne peut nullement apporter de notion statistique) à 96 heures de culture avec la tuberculine brute, ne trouvent aucune mitose, alors qu'il existe respectivement 14 et 56 % de formes blastiques.

La plupart des auteurs comptant les mitoses, ajoutent quelques heures avant la lecture soit de la colchicine, soit de la vinca-leucoblastine pour bloquer les mitoses en métaphase, ce qui a pour effet d'augmenter le nombre des mitoses dans la préparation au moment de la lecture.

Enfin, dans les cultures témoins, il apparait un certain pourcentage de mitoses spontanées ; ce pourcentage est minime, mais celui obtenu par stimulation l'est aussi ; il a donc son importance.

Au totel, s'il apparait une concordance entre l'état allergique et le pourcentage de mitoses, cette concordance est limitée dans son intérêt, par le faible pourcentage obtenu ; pourcentage qui n'évolue pas toujours parallèlement au pourcentage de transformation blastique.

L'intérêt, à notre avis, du comptage des blastes plutôt que des mitoses, tient d'abord à leur nombre, beaucoup plus important, qui fait apparaitre une différence hautement significative en culture, entre les sujets allergiques et anergiques à la tuberculine.

- D'autre part à leur facilité, pour un observateur entraîné, de reconnaissance et de différenciation des éléments cellulaires intermédiaires.

Ces deux facteurs, limitant les causes d'erreur liées aux conditions de culture. En particulier l'absence d'adjonction de colchicine, ne modifie pas le nombre final de blastes, alors qu'il modifie le nombre final de mitoses.

Comparons maintenant les méthoces morphologiques aux méthodes isotopiques :

- Méthodes morphologiques et autoradiographiques :

Nous avons vu, que, du fait des techniques différentes, il était difficile de comparer les divers résultats. Nous nous réfèrerons donc au travail de COWLING (13-14-15) qui étudie parallèlement, le pourcentage de blastes et le pourcentage de cellules marquées, mesuré par autoradiographie sur une courte série.

Il n'y a pas de concordance exacte entre le pourcentage de blastes, et celui des cellules incorporant la thymidine tritiée.

- Au 3ème jour de culture :

- Avec la PHA : Le pourcentage de cellules marquées est moins important que le nombre de blastes, chez les sujets allergiques.
Moyennes à 3 jours : Blastes : 44 %
Cellules marquées28 %

- Avec la tuberculine brute : Le pourcentage moyen de cellules marquées, est pratiquement équivalent au % de blastes chez les sujets MANTOUX +:Moyernes à 3 jours : Blastes : 2,3 %
Cellules marquées : 2,5 %

- Au 7ème jour de culture :

- Avec la PHA : L'écart s'accentue entre le pourcentage moyen de blastes, 75 %, et le pourcentage moyen de cellules marquées, 5 %.

- Avec la tuberculine : Le pourcentage moyen de blastes, 13 %, est également supérieur au % moyen de cellules marquées : 4 %.

Il apparait donc un décalage entre le nombre de cellules marquées, et le nombre de blastes.

Le pourcentage de cellules marquées peut être considéré comme le pourcentage de cellules ayant incorporé la thymidine pour la synthèse nucléaire des protéines.

Avec la PHA, il y a donc un maximum de synthèses protéiques nucléaires au 3ème jour, alors que le nombre de blastes continue d'augmenter et est maximum au 7ème jour.

Avec la tuberculine la transformation blastique est plus lente, maximum au 7ème jour, comme par la PHA, mais la synthèse protéique continue d'augmenter jusqu'au 7ème jour.

Pour la tuberculine, il y a donc une évolution parallèle entre le pourcentage de blastes et de cellules marquées. Les pourcentages ne sont pas équivalents, mais évoluent dans le même sens.

Il y a précession des phénomènes de synthèse nucléaire sur la transformation morphologique des lymphocytes ; cette précession est surtout nette en début de culture, puis la transformation blastique prime la synthèse nucléaire.

Si on ne peut donc pas prétendre que transformation blastique et incorporation de thymidine expriment exactement le même phénomène d'évolution cellulaire sous l'influence de la tuberculine, on peut cependant dire qu'elles expriment toutes les deux la dynamique d'un même phénomène.

Si l'on compare d'ailleurs les résultats de KERBY (29) p. 44-45 utilisant le pourcentage de cellules marquées avec nos propres résultats, utilisant le pourcentage de blastes, on constate que les courbes de répartition, des pourcentages en fonction de l'allergie cutanée, sont très voisines.

Ces deux méthodes étant superposables, et la technique d'incorporation de thymidine longue et complexe, il nous semble plus utile d'utiliser la méthode morphologique, beaucoup moins longue, et plus simple.

Méthodes Morphologiques et isotopiques utilisant un compteur à scintillation.

Les mêmes réserves concernant la comparabilité des résultats doivent être formulées, accentuées du fait que certains auteurs utilisent, comme précurseurs radioactifs, de la thymidine tritiée, d'autres du carbone marqué ; enfin que CARON (7-8) exprime ses résultats en désintégration par minute DPM, chiffre d'autant plus faible que la thymidine a été incorporée, alors que CHAPARAS les exprime en coups par minute d'autant plus élevé que l'incorporation est importante.

Si nous examinons la courte série morphologique de COWLING (p.25) et la première étude de CARON (p.32-34) étudiant à 7 jours de culture l'incorporation de la thymidine C14 (les résultats étant relativement comparables du fait de méthodes de culture voisines : sujets MANTOUX + nombre de cellules en culture identique, même concentration de vieille tuberculine) on constate les faits suivants :

- Avec les méthodes morphologiques, COWLING (13-14-15) obtient
  PHA une moyenne de 75 % de blastes
  Tuberculine " " " 13 % de blastes

- Avec la mesure de désintégration par minute :
  PHA : 8000 DPM
  Tuberculine : 11000 DPM,

Le nombre de DPM, , obtenu avec la tuberculine, est 1,5 fois plus forte qu'avec la PHA, alors qu'avec les méthodes morphologiques, la différence est 6 fois plus importante.

CARON modifie alors sa méthode de culture suivant les remarques de COOPER (10) (à savoir que les polynucléaires et les lymphocytes dégradent rapidement la thymidine en thymine et dihydrothymine qui ne s'incorporent plus à l'ADN cellulaire) . La thymidine tritiée remplace la thymidine C 14, surtout le temps d'incubation thymidine culture de 24 heures, est ramené à 1 heure, et l'activité de de la thymidine augmentée de 0,1 µ. CURIE à 2,5µ CURIE. Les résultats des comparaisons deviennent alors assez différents.

COWLING :	PHA	: 75 % de blastes
	Tuberculine	: 13 % de blastes
CARON :	PHA	: 53.760 DPM
	Tuberculine	:364.000 DPM

La différence entre la méthode morphologique et la méthode isotopique est alors beaucoup moins marquée.

Dans la méthode morphologique, il y a toujours 6 fois plus de blastes avec la PHA au 7ème jour, et si l'on multiplie par 6 la DPM avec la PHA, on obtient un chiffre de 322.560, donc relativement proche des 365.000 DPM obtenus réellement.

Les DPM dans les cultures de contrôle étant toujours nulles, par la méthode de CARON, on peut penser, bien que de longues séries manquent, qu'il existe une assez bonne corrélation entre les méthodes morphologiques et les méthodes isotopiques comptant les désintégrations par minute.

CHAPARAS (9) en comptant les coups par minute cpm, est obligé d'exprimer ses résultats sous forme d'un rapport, du fait de l'incorporation de thymidine dans les cultures non stimulées.

$$S/C = \frac{\text{CPM culture stimulée}}{\text{CPM cultures non stimulées}}$$

Ceci dit, ses résultats sont en bonne corrélation avec l'état d'allergie cutanée. Mais il existe cependant une cause d'erreur du fait de CPM dans les cultures non stimulées.

Finalement, il est à remarquer, que les méthodes employées par les divers auteurs, pour attester de la transformation des lymphocytes sous l'influence de la tuberculine, sont extrêmement variées dans leurs composantes techniques, tant dans les méthodes morphologiques que dans les méthodes isotopiques.

Et si nous pouvons dire que, grossièrement, les résultats sont assez voisins entre les différentes méthodes morphologiques, entre ces méthodes et les méthodes isotopiques, il faut cependant dire que toutes ces techniques ne sont vraiement et précisement comparables qu'entre les mains deleurs auteurs, et qu'il est difficile de les comparer les unes aux autres.

VIII - Corrélation entre l'allergie cutanée et la réaction in vitro

Nous discuterons conjointement les résultats des divers auteurs et les nôtres.

La réalité d'une réponse blastique à la tuberculine dans les cultures de lymphocytes provenant de sujets allergiques étant démontrée, il reste beaucoup à apprendre de l'analyse quantitative des résultats recueillis sur des séries suffisamment longues d'examens. Les travaux concernant le problème sont assez restreints et les résultats sont assez divergents.

GUMP (21) et ses collaborateurs ne trouvent aucun parallélisme net entre les réactions cutanées et la réponse lymphocytaire.

MAC FARLAND et COLL (26) établissent une relation grossière entre les dimensions des réactions cutanées et le pourcentage de transformation blastique. Par contre, KERBY retrouve une corrélation très étroite entre les deux phénomènes (29).

A la lumière de ces données, discutons nos propres résultats : le problème étant de savoir si l'on peut remplacer les tests cutanés par les tests in vitro.

La discussion doit donc décrire les mérites respectifs et les causes d'erreurs des deux méthodes d'exploration de l'allergie tuberculinique.

a) Résultats d'ensemble :

- Si l'on classe les sujets selon l'importance de leurs réactions cutanées à la tuberculine, KERBY (29) avec la tuberculine PPD et la méthode autoradiographique, obtient un pourcentage différent de cellules marquées, pour chaque catégorie d'allergie cutanée. GUMP (21) trouve également une répartition différente selon l'allergie.

- Nous-mêmes (p. 48-49-50) selon que les sujets réagissent ou non à 2, 10 ou 50 Unités de tuberculine IP48, le pourcentage moyen de blastes est différent. Un taux de transformation blastique entre 5 et 10 % correspond à une sensibilité cutanée de 10 à 50 unités. Avec une allergie cutanée plus forte (sensibilité à 2 unités), la marge laissée à la réponse lymphocytaire est grande, allant de 10 à plus de 30 % de lymphoblastes.

- Avec la tuberculine PPD: on retrouve les mêmes résultats.
- Tests cutanés positifs à 5 unités de PPD (diamètre d'induration de 15 mm): moyenne du pourcentage de cellules marquées : 10,77 %.

- Tests cutanés positifs à 5 unités (diamètre d'induration 15mm): moyenne du pourcentage de cellules marquées : 20,7 %.

La précision n'est plus la même en cas d'allergie faible (KERBY 39-nos résultats). Les cultures lymphocytaires semblent incapables de déceler l'existence d'une allergie tuberculinique, très atténuée et le pourcentage de cellules marquées ou le pourcentage de blastes est pratiquement nul chez les sujets qui ne réagissent pas à l'inoculation de 250 unités de PPD ou de 50 unités de tuberculine IP 48. (pas de différence significative entre les groupes 1 et 2 chez KERBY).

b) Discordance entre les réponses cutanées et lymphocytaires

Bien que KERBY (39) ait trouvé une relation entre le logarithme de la dose de tuberculine et le diamètre moyen de l'induration. Il nous a été impossible de mettre en évidence une corrélation statistiquement significative entre le nombre de lymphoblastes et le diamètre de l'infiltrat dermique au sein de chacune des catégories de sujets à allergie cutanée comparable. Quelques soient les travaux, les écarts par rapport à la moyenne dans les deux sens sont donc fréquents et leur interprétation n'est pas aisée.

On serait tenté d'accorder plus de valeur à la réponse in vitro, qui ignore les nombreux et imprévisibles facteurs de variation inhérents à tout test intradermique (quantité exacte de tuberculine injectée, diffusion hors de la zone centrale) état de la peau, difficultés de mensuration du diamètre de l'infiltrat). Mais il se peut également que ces écarts ne traduisent, non pas une imperfection technique de l'un des tests, mais une différence authentique de la sensibilité de la peau et des lymphocytes vis-à-vis de la tuberculine.

Les discordantes flagrantes qui apparaissent quelquefois entre les résultats des tests cutanés et in vitro franchement positifs par l'une d'elles et négatifs par l'autre, sont encore plus troublantes. En particulier, nous avons vu que MAC FARLAND (36) (p.42) et plus récemment CHAPARAS (9) ont montré que les réactions croisées aux extraits de mycobactéries de diverses espèces, ne sont pas rigoureusement identiques pour la peau et pour les lymphocytes, de sorte qu'une réaction cutanée négative à la tuberculine classique PPDS, peut aller de pair avec une réaction in vitro positive, les lymphocytes pouvant être seuls sensibles aux extraits de plusieurs souches microbiennes.

Nous avons vu également dans les travaux de ZWEIMAN (50-51) une négativité des réactions cutanées tuberculiniques compatibles avec une bonne stimulation lymphocytaire chez le cobaye carencé en vitamines C, et rendu sensible à la tuberculine par l'injection de l'adjuvant de FREUND.

Une telle discordance entre la sensibilité des lymphocytes parfaitement stimulable et la peau totalement indifférente, peut ressortir sans doute d'autres causes, telles une dénutrition profonde, et l'on connait de longue date l'affaiblissement de l'allergie tuberculinique chez les individus mal nourris.

A l'inverse, la persistance de la sensibilité cutanée avec abolition plus ou moins complète de la réaction lymphocytaire, semble être, comme nous le verrons plus loin, une éventualité assez fréquente en cas de tuberculose active.

En définitive, chacune des deux méthodes d'exploration de l'allergie tuberculinique présente ses avantages mais aussi ses limites et ses causes d'erreurs propres, et il semble prématuré de conclure comme MATSANIOTIS et CHAPARIS, que l'exploration in vitro fournit des informations plus utiles que les réactions de MANTOUX.

c - Problèmes particuliers aux personnes âgées :

Notre étude de la stimulation lymphloblastique a porté sur des personnes âgées, ce qui pose deux problèmes : les lymphocytes du vieillard sont-ils capables de réagir aux stimulants mitogènes de la même façon que ceux des sujets jeunes ou adultes ?

La sensibilité des lymphocytes à la tuberculine persiste-t'elle chez le vieillard dont l'allergie tuberculinique s'est éteinte ?

- L'aptitude des lymphocytes à subir la transformation blastique in vitro dans les cultures à court terme, varie sans doute avec l'âge du donneur, lorsqu'on expérimente un mitogène non spécifique comme la PHA. Il semble que le pourcentage des transformations blastiques soit moins important chez les sujets âgés que chez les jeunes, bien que cette affirmation soit contestée.

Il n'apparait par contre aucune différence entre les lymphocytes de sujets jeunes ou âgés en cas de stimulation antigénique spécifique. La blastogenèse étudiée dans les réactions leucocytaires mixtes des sujets âgés, par notre Maître S. LEVI, est tout à fait semblable à ce qu'elle est chez les jeunes. (32-33-34).

En ce qui concerne la tuberculine, si l'on compare les réactions lymphocytaires in vitro, chez les sujets âgés et chez les sujets jeunes qui ont acquis l'allergie tuberculeuse par une infection spontanée (et non par vaccination BCG), on ne peut mettre en évidence aucun écart réel, et quelque soit l'âge, la moyenne du pourcentage des blastes est la même pour une allergie cutanée d'intensité semblable. Le taux de lymphloblastes le plus fort que nous ayons trouvé chez nos sujets âgés, est de 31,11 %, taux voisin de celui obtenu par M.S. LEVI dans une série plus courte de personnes adultes.

- Nous avons vu que l'extinction fréquente des réactions cutanées à la tuberculine chez les sujets âgés est un phénomène retrouvé constamment et bien connu.

Dans une population, le pourcentage des sujets qui ne réagissent pas, s'accroît progressivement avec l'âge. D'autre part, chez certains sujets, une réaction forte au départ, s'atténue avec le temps et finit par s'effacer totalement.

L'allergie tuberculinique spontanément acquise, ne se maintient donc pas indéfiniment. On se pose alors la question de savoir si le sujet se retrouve dans l'état d'un individu totalement vierge de toute infection tuberculeuse. Ne persiste-t-il pas une capacité réactionnelle latente, susceptible de se manifester sous forme d'une réponse anamnestique plus précise à l'occasion d'une sollicitation immunologique renouvelée.

Il est logique de rechercher une réponse à cette question, dans l'étude du comportement des lymphocytes.

Selon la conception actuelle, comme nous l'avons vu en introduction, l'immunité de type retardé aurait son substratum biologique dans les lymphocytes à vie longue du sang périphérique, spécifiquement sensibilisés, qui peuvent survivre pendant des années sans subir de division, et conserver ainsi indéfiniment l'aptitude à proliférer au contact de l'antigène spécifique. Il devient alors intéressant de rechercher si les lymphocytes du vieillard ne gardent pas une aptitude réactionnelle à la tuberculine bien au delà de la date de disparition de leur sensibilité cutanée.

L'étude des réactions lymphocytaires de nos 77 sujets âgés aux réactions cutanées négatives, semble apporter une réponse négative à cette question.

Le pourcentage de blastes dans leur culture lymphocytaire est pratiquement nul, (0,41 % en incluant une réponse aberrante ; 0,16 % sans elle, contre 0,004 % dans les cultures témoins non stimulées), et le pourcentage de lymphocytes incomplètement transformés, est à peine plus élevé que chez les témoins (0,99 % contre 0,30 % dans les cultures témoins).

La disparition de la sensibilité tuberculinique du vieillard ne se limite donc pas au revêtement cutané, mais s'étend également aux lymphocytes.

Encore faut-il se demander si cette conclusion n'est pas erronée parce que la moyenne d'âge des sujets que nous avons étudiés est très élevée (80 ans). L'affaiblissement de l'allergie tuberculinique commençant vers la cinquantaine, on peut s'imaginer en effet, que la sensibilité cutanée s'effaçant en premier, laisse persister, intacte encore pendant quelques années, une aptitude réactionnelle des lymphocytes qui ne disparaitra à son tour que plus tard. C'est pourquoi l'examen des sujets âgés qui présentent des réactions tuberculiniques cutanées très faibles, mais non nulles réactions érythémateuses ou infiltrat minime à 50u.- est particulièrement intéressant. S'il est vrai que ces réactions traduisent une allergie tuberculinique, en train de s'évanouir, la sensibilité des lymphocytes dans cette hypothèse, devrait encore demeurer passablement intense.

L'examen de 33 cas, montre qu'il n'en est rien, et que la réaction lymphocytaire (1,40 % de blastes) n'est pas anormalement forte, si on la compare à celle de sujets dont la peau répond distinctement à 5 unités de tuberculine (6,67 %). Dans le processus de l'extinction des réactions tuberculiniques du vieillard, il n'est donc pas possible de démontrer une précession quelconque de la peau par rapport aux cellules porteuses de la mémoire immunologique spécifique.

IX - SIGNIFICATION DES REACTIONS DE TRANSFORMATION BLASTIQUE

Il est intéressant d'examiner quelle peut être la signification de la sensibilisation spécifique des lymphocytes.

Il est difficile d'admettre qu'une transformation lymphoblastique atteignant 20 % du nombre des lymphocytes en culture, corresponde à un tel nombre delymphocytes sensibilisés circulants.

Il est beaucoup plus probable que les cellules sensibilisées seraient en nombre beaucoup plus petit, ne dépassant pas 1 % des lymphocytes, et que dans les cultures cellulaires, avant que n'apparaissent les transformations morphologiques ou l'incorporation de la thymidine titrée, il y ait une libération d'une grande quantité de produits solubles qui impressionnerait de façon non spécifique les autres lymphocytes. Ainsi, on pourrait concevoir que sur une population de 10^6 lymphocytes/ml de culture, seulement 10^3 lymphocytes seraient sensibilisés spécifiquement à la tuberculine, et réagiraient avec celle-ci in vitro. Il y aurait ainsi 0,1 % de cellules réellement sensibles. On peut également imaginer qu'il puisse être libéré dans le milieu de culture dès les premières heures de la stimulation, des substances inductrices soluble non spécifiques, capables d'engendrer une transformation de 10^5 lymphocytes et davantage, aboutissant vers le 5ème jour, à l'apparition de 10 % ou plus de lymphocytes. On ne doit donc pas, à notre avis, considérer les cellules blastiques comme correspondant à autant de lymphocytes originellement sensibles à la tuberculine.

Malgré tout, il y a un certain rapport entre le nombre de cellules réellement sensibles, et la quantité de substance soluble libérée dans le milieu, et on ne peut considérer les résultats que l'on obtient en culture, que comme un résultat globale, qui reflète, soit le nombre de cellules originellement sensibles, soit le degré de leur sensibilité.

Il est probable d'ailleurs, que les mêmes considérations s'appliquent aux résultats des tests cutanés. Dans les tests cutanés, les réactions d'infiltration ne seraient pas dûes uniquement à l'afflux des lymphocytes sensibles, mais probablement à la conséquence locale de la stimulation d'un petit nombre de cellules sensibles qui, en collaboration avec des cellules d'autre nature comme les macrophages, ou par suite de libération locale de substances solubles, aboutiraient à la production de la réaction locale.

Là encore,l'intensité de la réaction dans son ensemble, doit être considérée comme le témoin de l'intensité de l'allergie tuberculinique.

En définitive, à la condition d'arriver à une techniquebien standardisée, les cultures de lymphocytes in vitro semblent être un test très utile pour la mesure quantitative de l'allergie tuberculinique, et qui gagne à être comparée avec les tests cutanés.

Il semble en fait, que la réaction lymphoblastique redevienne normale après l'épisode aigüe, ce qui serait en faveur de la deuxième hypothèse.

Cette hypothèse de THOMAS avec la PHA, se rapproche de l'interprétation de PEARMAIN avec la tuberculine, qui pense à un épuisement de la capacité de réaction des lymphocytes stimulés en permanence de la tuberculine provenant des BK présents dans l'organisme en cas de tuberculose active.

Un autre type d'explications du mécanisme est donné par HEILMAN (23-24-25) qui pense à l'existence, dans le sérum de sujets tuberculeux, d'un facteur d'inhibition de la transformation blastique.

En effet, si on cultive :

- Leucocytes de sujets tuberculeux, avec plasma de sujets tuberculeux, il n'y a pas de transformation blastique sous l'influence de la tuberculine.

- Leucocytes de sujets tuberculeux avec plasma de sujets sains, la transformation se produit avec la tuberculine.

Il est à noter que l'explication de THOMAS concerne la PHA, et celle de HEILMAN, la stimulation tuberculinique.

D'autres explications sont encore possibles, mais quelqu'en soit le mécanisme, cette particularité pose le problème de la signification profonde de la prolifération lymphoblastique sous l'action de la tuberculinique.

La réponse lymphocytaire pourrait en effet ne pas être une expression exclusive de l'allergie, elle pourrait renseigner également sur d'éventuels facteurs de l'immunité vis-à-vis de la tuberculose indépendants de l'allergie. En ce cas, la réapparition de l'aptitude à la prolifération, temporairement perdue par les lymphocytes, pourrait constituer un excellent critère de guérison. Nous rappellerons à ce sujet, que dans notre expérience sur les vieillards, tous les anciens tuberculeux étudiés présentaient des réactions cutanées et lymphocytaires concordantes ; la seule exception ayant précisément trait à une malade atteinte de lupus tuberculeux, chez qui les réactions cutanées étaient, comme c'est la règle particulièrement intense, en contraste avec une stimulation lymphocytaire quasi nulle, mais redevenue forte après guérison des lésions.

CHAPITRE VI

Aspects particuliers de la transformation lymphoblastique.

Nous n'avons jusqu'alors envisagé l'étude des réactions de transformation blastique que chez des sujets sains aux réactions cutanées positives ou négatives.

Il est intéressant de voir ce que deviennent ces réactions in vitro au cours de différents états pathologiques : tuberculose évolutive et syndromes comportant une anergie tuberculinique cutanée sarcoidose et syndrome lymphoprolifératif.

Bien que n'ayant pas étudié dans notre propre travail cet aspect du problème, nous allons donner maintenant un aperçu rapide de cette question.

1 - Transformation lymphoblastique au cours des tuberculoses évolutives.

Ce problème a été jusqu'à présent, assez peu étudié, et les expériences réalisées ne portent que sur de courtes séries.

Les techniques des cultures des lymphocytes sont les mêmes que précédemment, et ne sont pas plus standardisées.

Les résultats sont donnés dans les tableaux des pages suivantes :

Le fait le plus marquant chez les tuberculeux en évolution, est une dépression de la réaction de transformation lymphoblastique in vitro, qui contraste avec la persistance des réactions cutanées.

Cette abolition plus ou moins complète de la réaction lymphocytaire, attestée surtout par travaux comptant le nombre des mitoses, s'observe aussi bien avec la phytohemmagglutinine qu'avec une stimulation spécifique tuberculinique.

- Le mécanisme de cette inhibition de la réaction de transformation a fait l'objet de plusieurs hypothèses :

- THOMAS (49) en ce qui concerne l'inhibition par la PHA, pense qu'il existe un vice des lymphocytes chez le sujet tuberculeux actif ou stabilisé ; car si l'on cultive les lymphocytes du sujet tuberculeux avec un plasma provenant de sujet sain, l'index mitotique reste bas alors que le plasma de sujet tuberculeux, n'a pas d'action sur les lymphocytes de sujet sain. Ce vice des lymphocytes, ayant pour corollaire, une altération de l'immunité cellulaire chez les tuberculeux, l'auteur pose le problème de savoir si cet index mitotique bas est congénital, et favoriserait alors l'infection tuberculeuse, ou acquis secondairement du fait de l'infection tuberculeuse.

Résultats des réactions de stimulations lymphocytaires chez les tuberculeux actifs :

- Les premiers à signaler le fait sont PEARMAIN (43) et LAGETTE en 1963. Sur une série de 14 sujets :
  9 sujets sains MANTOUX +
  3 tuberculeux guéris
  2 sujets tuberculeux actifs

Les deux sujets tuberculeux actifs ne présentent aucune mitose en culture mais seulement quelques changements morphologiques des leucocytes.

- Depuis cette première observation des faits identiques ont été noté :

Avec la PHA par THOMAS (49)

L'index mitotique est plus faible chez les tuberculeux évolutifs que chez les sujets sains :

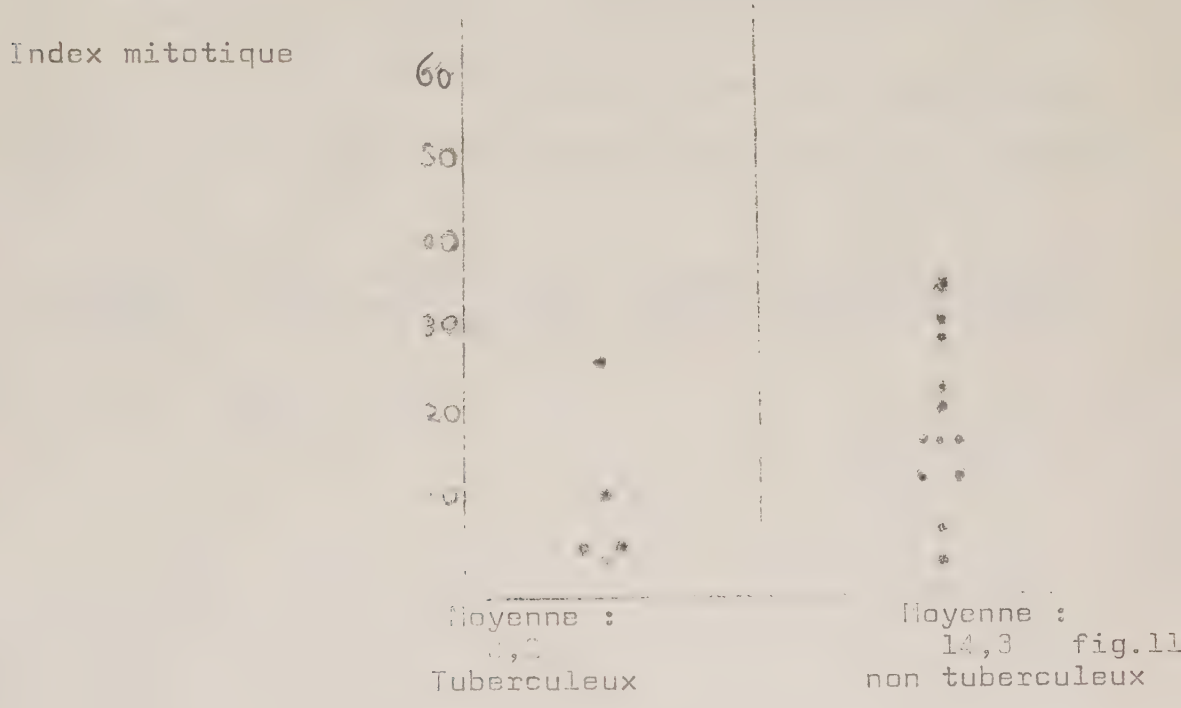


fig.11

- Hélène C.RAUCH (46) obtient également par la PHA les résultat suivants :

TABLEAU XXV

	Sujets normaux	Vaccinés BCG	Sujets tuberculeux
+ x pour cent	3,4 (1,--12,0)	3,4 (1,0-10,7	1,4 (0,2-4,1)

Réponses mitotiques comparatives de la stimulation par PHA de cultures de leucocytes.

- KRAVIS (36) et collaborateurs ; étudient chez 19 enfants, aux tests tuberculiniques positifs (dont 5 ont une tuberculose active et les autres une tuberculose stabilisée) le pourcentage de mitose en culture avec stimulation par la PHA et PPD.

Des enfants aux réactions tuberculiniques négatives servent de contrôle :

Aucun enfant ne reçoit de thérapeutique corticoïde ou immunodépressive.

+ = Chimiothérapie par INH commencé alors que le diagnostic était en suspend, arrêté par la suite quand l'absence de tuberculose a été prouvée.

Résultats p. 77. Tableau XXVI

TABLEAU XXVI

Sexe	Age	tuberculose active actuelle	tests cutanés	BK	Mitoses/100 cellules nucléées cellules cultivées avec : UT ou PPD	sans réactif	PHA	Chimiothérapie antituberculeuse.
M	9	-	+	+	52	0	101	+
M	12	-	+	-	32	0	89	+
M	2	+	+	-	8	1	59	+
F	9	-	+	non fait	57	0	86	+
M	13	-	+	"	9	0	113	?
F	9	-	+	+	14	0	77	+
F	11	-	+	non fait	13	0	69	+
F	6	+	+	-	9	0	39	+
M	4	-	+	non fait	21	2	62	+
M	1	-	+	"	10	0	60	+
F	1	+	+	-	14	5	42	+
F	1	+	+	+	8	0	67	+
M	5	-	+	non fait	37	4	80	+
F	12	-	+	non fait	24	0	201	-
M	13	-	+	"	21	1	63	?
M	7	+	+	-	24	0	52	+
M	10	-	++	+	11	0	84	+
M	12	-	+	non fait	8	0	39	+
F	9	-	+	"	0	0	90	+
F	1	-	-	"	1	0	43	-
M	2	-	-	"	0	0	49	-
M	9	-	-	"	1	0	104	-
F	11	-	-	"	1	0	183	-
F	7			"	0	0	96	-
M	3			"	1	0	78	-
M	3			5	0	0	69	-
M	5			"	0	0	45	-

SAMIOTIS (38) retrouve les mêmes faits.
ls.GUMP C. HIRSHORN (21-26-27) (sur 2 cas) ne mettent pas en évidence réactions déprimées chez les sujets tuberculeux actifs.

II - Transformation blastique au cours d'affections anergisantes: sarcoïdose et syndromes lymphoprolifératifs.

On sait que certaines affections telle la sarcoïdose ou les affections malignes du système lymphatique, s'accompagnent assez fréquemment d'une anergie cutanée à la tuberculine. La survenue d'une anergie cutanée tuberculinique chez un sujet présentant des manifestations ganglionnaires, est d'ailleurs en faveur du diagnostic de ces affections. On peut alors se demander ce que deviennent les réactions de transformation lymphoblastique dans de telles affections ; c'est ce qui a été étudié par deux auteurs COWLING et HIRSCHORN. Nous avons reproduit ici les résultats de HISCHORN qui sont les plus démonstratifs (p.[illegible]) tableau XXVII.

Comme on pouvait s'y attendre, les résultats des stimulations par PHA et PPD sont différents de ce que l'on observe chez le sujet sain.

Au cours aussi bien de la sarcoïdose que des affections ganglionnaires malignes,
on observe :

- un pourcentage spontané de blastes et de mitoses très élevé.
- une réponse nettement diminuée avec la PHA
- une très faible réponse à la tuberculine chez les sujets MANTOUX négatifs.

Tous ces faits apportent encore la preuve de la nature immunologique du phénomène de transformation blastique et confirme que la réaction blastique est le support des réactions cutanées.

TABLEAU XXVII

ETAT CLINIQUE	DUREE MALADIE	Dg BIOPSIE organe	Dg BIOPSIE test de KWEIM	Test de MANTOUX	BLASTES ET MITOSES % PHA 3j	Contrôle 5j	PPD 125 UT 5j	Contrôle 8j	antigène KWEIM
Contrôle				+ ou -	35-95	4-10	4-40	3-15	3-15
Sarcoïdose	4 ans	nodule lymphoïde	+	- 250 UT	61	19	21	14	27
"	1 mois	"	+	- 250 UT	57	18	17	16	25
"	1 an	nodule ganglion.	+	- 250 UT	78	6	6	22	36
"	7 ans	"	+	- 250 UT	59	NF	NF	4	6
"	2 ans	NF	+	- 10 UT	62	38	35	49	63
"	18 ans	gangl.	+	+ 250 UT	91	14	13	10	29
"	1 an	gangl.	+	+ 250 UT	48	24	36	21	41
"	2 ans	NF	+	+ 10 UT	78	10	37	21	30
"	6 mois	gangl.	-	+ 10 UT	56	NF	NF	6	12
"	2 ans	NF	+	+ 10 UT	83	7	47	8	6
Tuberculose active	1 mois	NF	NF	+ 1 UT	93	7	34	6	7
"	2 semaines	NF	NF	+ 1 UT	91	9	28	11	9
Hodgkin	1 an	NF	NF	- 250 UT	64	19	20	NF	NF
Lymphosarcome	6 mois	NF	NF	- 250 UT	59	23	NF	NF	NF
Lympho-blastome	2 ans	NF	NF	- 250 UT	76	14	16	NF	NF
Leucémie lymphoïde	3 ans	NF	NF	- 250 UT	51	21	24	NF	NF
"	1 an	NF	NF	- 250 UT	54	23	21	NF	NF

NF = non fait

- CONCLUSION -

1.- La transformation lymphoblastique des petits lymphocytes du sang circulant, cultivés in vitro, en présence de tuberculine est un exemple typique de stimulation lymphocytaire par des antigènes spécifiques. La réponse s'observe couramment chez les sujets ayant été exposés au bacille tuberculeux et fait défaut chez les individus vierges de toute infection tuberculeuse.

2.- L'étude quantitative du phénomène est plus difficile en raison de la diversité des techniques utilisées. Les réponses peuvent varier beaucoup selon le mode d'isolement des suspensions lymphocytaires, la composition des milieux de culture, la nature et la concentration des préparations tuberculiniques stimulantes, la durée de l'incubation. L'incorporation intra-cellulaire de précurseurs des acides nucléiques marqués par des isotopes n'est pas toujours strictement parallèle au nombre des cellules transformées. L'examen morphologique des éléments cellulaires, singulièrement le dénombrement des lymphoblastes, à l'exclusion des formes incomplètement transformées, fournit des renseignements non moins précis que les méthodes isotopiques.

3.- La comparaison entre l'intensité de la transformation blastique in vitro et celle des réactions cutanées à la tuberculine n'est utile que si l'on étudie un nombre important d'individus. Chez les sujets indemnes de lésion tuberculeuse, la corrélation entre les deux méthodes d'exploration apparait alors de façon indiscutable. Les personnes qui répondent p.. une réaction phlycténulaire à l'injection intradermique de deux unités de tuberculine ont des taux de transformation les plus élevés ; celles qui ne réagissent pas à l'innoculation de 50 U, ont généralement un taux de transformation nul. Une sensibilité cutanée à 2 U de tuberculine, se traduit in vitro par un pourcentage de lymphoblastes supérieur à 10 ; les réactions dermiques positives à 10 ou 50 unités seulement correspondent à un taux lymphoblastique compris entre 5 et 10 % ; les infiltrats cutanés minimes ou des réactions purement érythémateuses provoquées par 50 U accompagnent habituellement des réponses lymphoblastiques inférieures à 5 %.

4.- Ce parallélisme très net entre la réponse cutanée et lymphocytaire à la tuberculine n'a cependant qu'une valeur statistique. Au sein de chaque catégorie de sujets caractérisée par le même seuil de sensibilité cutanée, il n'y a pas de corrélation significative entre la dimension de l'infiltrat dermique et le pourcentage des lymphoblastes ; le chevauchement des taux de lymphoblastes entre catégories différentes est assez important ; des résultats franchement aberrants s'observent quelques fois. La dissociation entre les deux modes d'exploration de la sensibilité tuberculinique semble fréquente en présence d'une lésion évolutive.

5.- C'est précisément cette dissociation apparente chez un certain nombre de sujets qui semble constituer une voie de recherche intéressante dans l'étude comparative entre l'immunité et l'allergie à la tuberculose. Cette recherche ne peut être valable que pour l'investigation faite sur un grand nombre de personnes, dans des conditions physiologiques et pathologiques diverses, par l'utilisation d'une technique standardisée.

Vu le Président de Thèse

signé: KREIS

Vu le Doyen de la Faculté

signé: F. DELBARRE

Vu et Permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de

P A R I S

Signé: R. MALLET

BIBLIOGRAPHIE

(1) AISENBERG (A.C.)- Quantitative estimation of the reactivity of normal and Hodgkin's disease lymphocytes with thymidine 2-C14 Nature, 205, 1233-1234, 1965.

(2) ASPEGREN (N) and RORSMAN (H.) Mitosis-stimulating effect of tuberculin on lymphocytes from peripheral blood. J. Allerguy, 35, 433-437, 1964.

(3) AURICH (G) und PLENERT (W). Ueber die Abhangigkeit der Lymphozytentransformation von unterschiedlichen Kulturbedi-guagen und vom Alter. Folia Haematol, 92, 131-143, 1969

(4) BIRMINGHAM (A.T.). The log dose relationship for intradermal old tuberculin in tuberculous patients. Tubercle, 43 - 287-291, 1962.

(5) CANETTI (G). L'allergie tuberculeuse chez l'homme. Flammarion, édit. Paris, 1946.

(6) CANETTI (G) et LACAZE (H). Données nouvelles sur l'évolution et la signification de l'allergie tuberculinique. Les grandes tendances évolutives de l'allergie tuberculinique chez les sujets non tuberculeux. Allergie et réinfection. Ann. Inst. Pasteur, 65 - 435-468, 1940.

(7) CARON (G.A.). Lymphocyte transformation induced by différent doses of tuberculin as measured by tritiated thymidine up-take. Ant. Arch. Allergy, 30 , 67-73, 1966.

(8) CARON (G.A.) - SARKANY - WILLIAMS (H.S.) - TODD (Anne P.) Radioactive Method for the measurement of lymphocyte trans-formation in vitro. The Lancet, 1266-1267, 1965.

(9) CHAPARAS (S.D.), SHEAGREN (J.N.), DE MEO (A.) and HEDRICK (S. Correlation of human skin reactivity with lymphocyte trans-formation induced by mycobacterial antigens and histolasmin. Amer. Rev. resp. Dis. 101, 67-73, 1970.

(10) COOPER (Edward H.) Measuring Lymphocyte Transformation The Lancet, 1, 51-52, 1966.

(11) COULSON (A.S.) and CHALMERS (D.G.). Response of human blood lymphocytes to tuberculin PPD in tissue culture. Immunology, 12, 417-429, 1967

(12) COULSON (A.S.) and CHALMERS (D.G.). Quantitation of peri-phéral blood lymphocyte cultures. Nature, 209 - 378-381 1966.

.../...

(13) COWLING (D.C.) and QUAGLINO (D.) Effect of some antigens on leucocyte cultures. J. Path. Bact. 89, 63-70, 1965.

(14) COWLING (D.C.) and QUAGLINO (D.) and BARRET (P.K.M) Effect of kveim antigen and old tuberculin on lymphocytes in culture fromsarcoid patients. Brit. méd.J., 1 - 1481-1482, 1964.

(15) COWLING (D.D.) QUAGLINO (D.) and DAVIDSON (E.). Changes induced by tuberculin in leucocyte cultures. Lancet, 2 1091-1094, 1963.

(16) DEQUEKER (J.), BAEYENS (J.P.), CLAESSENS (J. and GYSELIN A.). Evolution of tuberculin sensitivity with advancing age. A three years follow-up study. Géront. clinica, 10 - 369-374, 19

(17) EDWARDS (L.B.), PALMER (C.E.) and MAGNUS (K.) . La vaccination par le BCG. Monographie de l'OMS. Masson et Cie, édit. Paris, 1954.

(18) ELVES, ROATH. The response of Lymphocyte to antigen challenge in vitro. Lancet.1963,906.

(19) FITZGERALD (P.H.). The immunological role and long life-pan of small lymphocytes. J. theoret. Biol. 6, 12-25, 1964.

(20) GOUJARD (J.). Exploration de la sensibilité tuberculinique chez les sujets âgés. Thèse Médic. Paris, 1969.

(21) GUMP (D.W.), FEKETY (F.R.Jr.) URBANETTI (J.) and MUSENZO (C.) Studies of human leukocyte culture as in vitro test of delayed hypersensitivity. Amér. Rev. resp. Dis., 95, - 470-476, 1967.

(22) HARTOG (M.), CLINE (M.J.) and GRODSKY (G.M.). The response of human leucocyte cultures to stimulation tuberculin and phytohaemagglutinin measured by the uptake of radioactive thymidine. Clin. exp. Immunol., 2 - 217-228, 1967.

(23) HEILMAN (D.H.) and MAC FARLAND (W.). Mitogenic activity of bacterial fractions in lymphocyte cultures.- I. Purified protein derivative and polysaccharides of tuberculin. J. Immunol., 96 - 990-991, 1966.

(24) HEILMAN (D.H.) and MAC FARLAND (W.). Inhibition of tuberculin induced mitogenesis in cultures of lymphocytes from tuberculou donors. Int. Arch. Allergy, 30 - 58-66, 1966.

.../...

(25) HEILMAN (D.H.) and MC FARLAND (W.). Cellular interactions during antigen induced blastogenesis in leucocyte cultures. Fed. Proc., 26 - 528, 1967.

(26) HIRSCHHORN (K.), BACH (F.), KOLODNY (R.L.), FIRSCHEIN (I.L.) and HASHEM (N.) Immune response and mitosis of human peripheral blood lymphocytes in vitro. Science, 142 - 1185-1187, 1963.

(27) HIRSCHHORN (K.) KOLONDNY (R.L.), HASHEM (N.) and BACH (F.) Mitogenic action of phytohaemagglutinin. Lancet, 11 - 305-306, 1963.

(28) HIRSCHHORN (K.) SCHREIBMAN (R.R), BACH (F.H.) and SILTZBACH (L.E.). In vitro studies in lymphocytes from patients with sarcoidosis and lymphoproliferative disease. Lancet, 11 - 842-843, 1964.

(28b) KERBER (S.) et LEWI (S.). La transformation blastique du lymphocyte. Méd. Int., 4 - 133- 1969.

(29) KERBY (G.R.). Correlation of tuberculin skin reaction with in vitro lymphocyte transformation. Amér. rev. resp. Dis., 97 - 904-908. 1968.

(30) KRAVIS (L.P.), DORSKY (G.J.), LECKS (H.I.) and BHAGWAT (S.). Detection of tuberculin sensivity in children by leukocyte culture. Amer. J. Dis. Child., 115 - 247-252, 1968.

(31) LEWI (S.). La réaction leucocytaire mixte. Influence des groupes érythrocytaires ABO et Rh. Rev. Franç. Transf. 13 - 189-195, 1970.

(32) LEWI (S.) Allergie cutanée tuberculinique et transformation blastique des lymphocytes cultivés in vitro en présence de tuberculine. Corrélations chez 208 sujets âgés. Extrait des Annales de l'Institut Pasteur, 119 - 630-645, 1970.

(33) Revue Française Gérontologie 1971 n° 2 p. 39.

(34) LEWI (S.), KERBER (S.) Transformation lymphoblastique in vitro et réaction cutanée à la phytohémagglutinine chez les personnes âgées. Gérontologie, 16 , 16-24, 1970.

(35) LING (N.R.) and HUSBAND (E.M.). Specific and non-specific stimulation of peripheral lymphocytes. Lancet, 1, 363-365, 1964

(36) MC FARLAND (W). Hand HEILMAN (D.H.). Comparison of lymphocyte transformation and intradermal reactions to tuberculin. Amér. Rev. resp. Dis., 93, 742-748, 1966.

(37) MARSHALL (W.H.) and ROBERTS (K.B.). Tuberculin-induced mitosis in peripheral blood leucocytes. Lancet, 1 , 772 - 1963.

.../...

(38) MATSIANOTIS (N.), TSENGHI (C.), ECONOMOU-MAUROU (C.) and METAXOTOU-STAVRIDAKI (C.) Skin Hypersensitivity and in childhood, J. Pediat. 72, 599-605, 1968.

(39) MILLS (J.A.) The immunological significance of antigen induced lymphocyte transformation in vitro. J. immunol., 97, 239-247, 1966.

(40) NOWELL (P.C.). Unstable chromosome changes in tuberculin-stimulated leukocyte cultures from irradiated patients. Evidence for immunologically committed, long-lived lymphocytes in human blood. Blood, 26 , 798-804, 1965;

(41) OPPENHEIM (J.J.), HER H (E.M.) and BLOCK (J.B.). The response of column purified lymphocytes to phytohemagglutinin, anti leukocyte seran and antigenic stimulants. J.R.E.S. Soc. 3, 372, 1966.

(42) OPPENHEIM (J.J.), LEVENTHAL (B.G.), and HERS. (E.M.). The transformation of column-purified lymphocytes whith non spécific and specific antigeni stimuli J. Immunol., 101, - 262-270, 1968.

(43) PEARMAIN (G.),)LYCETTE (R.R.) and FITZGERALD (P.H.). Tuberculin induced mitosis in peripheral blood leucocytes. Lancet 1, 637-638, 1963.

(44) PENTYCROSS (C.P.). Lymphocytes transformation in youg people. Clin. exp. Immunol., 5, 213-216, 1969.

(45) PISCIOTTA (A.V.), WESTWING (D.M.) DE PREY (C.) and WALSH (B.) Mitogenic effect of Phytohaemagglutinin at different ages. Nature, 215, 193-194, 1967.

(46) RAUCH (H.C.). Response of leukocytes in culture from tuberculous patients and vaccinated subjects. Amér. Rev. resp. Dis., 95, 220-229, 1967.

(47) RIGGIO (G.), GARDINI (G.) e PEGORARO (M.). Valutazione del comportamento evolutivo dei linfociti umani in coltura con fitoemagglutinina nell'età senile. Boll. Soc. Cult. Méd. Novar. 43, 341, 1966.

(48) SCHREK (R.) Cell Transformations and mitoses produced in vitro by tuberculiin purified protein derivative in human blood cells. Amer. Rev. resp. Dis., 87, 734- 738, 1963.

(49) THOMAS (J.W.) NAIMAN (S.C.) and CLEMENTS (D.) Lymphocyte transformation by phytohemagglutinin. - II. In the tuberculous patients. Canad. med. Ass. J., 97, 836-840, 1967.

(50) ZWEIMAN (B.), BESDINE (R.W.) and HILDRETH (E.A.) Tuberculin-induced mitotic response in tuberculin-sensitive guineapigs. Nature, 212 - 422-423, 1966.

(51) ZWEIMAN (B.) BESDINE (R.W.) and HILDRETH (E.A.) The effect of the scorbutic on tuberculin hypersensitivity in the guinea-pig.- II. In vitro mitotic response of lymphocytes J. Immunol. 96, 672-675, 1966.

(52) TIMOFEJEWSKY (A.D) and BENEWOLENSKAJA (S.W)
Tuberculous inoculation in the cultures of leucocytes of the human blood Arch. exp. ZELLFORSCH, 4, 64, 1927.